ORSAY
Série A.
N° d'ordre
945

THESE

PRESENTEE

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

ROSENMAN ép. WEINTRAUB Hala Hadassa

1ere THESE

ETUDE STRUCTURALE DE LA $\Delta^{5\rightarrow4}$ 3-OXOSTEROIDE ISOMERASE DE PSEUDOMONAS TESTOSTERONI ET PARTICIPATION ENERGETIQUE DU SOLVANT AQUEUX A LA REACTION ENZYMATIQUE DE TRANSFERT DE PROTONS.

Soutenue le 6 juin 1972 devant la Commission d'examen

MM.	TONNELAT	Président
	CLAUSER	Examinateurs
	BAULIEU	Examinateurs
Mme	ALFSEN	Rapporteur

ORSAY
Série A.
N° d'ordre.
945

THESE

PRESENTEE

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

ROSENMAN ép. WEINTRAUB Hala Hadassa

1ere THESE

ETUDE STRUCTURALE DE LA $\Delta^{5\rightarrow4}$ 3-OXOSTEROIDE ISOMERASE DE PSEUDOMONAS TESTOSTERONI ET PARTICIPATION ENERGETIQUE DU SOLVANT AQUEUX A LA REACTION ENZYMATIQUE DE TRANSFERT DE PROTONS.

Soutenue le 6 juin 1972 devant la Commission d'examen

MM.	TONNELAT	Président
	CLAUSER	Examinateurs
	BAULIEU	Examinateurs
Mme	ALFSEN	Rapporteur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mon mari et à ma fille

ETUDE STRUCTURALE DE LA $\Delta_{5\rightarrow4}$ 3-OXOSTEROIDE ISOMERASE DE PSEUDOMONAS TESTOSTERONI ET PARTICIPATION ENERGETIQUE DU SOLVANT AQUEUX A LA REACTION ENZYMATIQUE DE TRANSFERT DE PROTONS.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire du Professeur Baulieu, Unité de Recherches sur le Métabolisme Moléculaire et la Physio-Pathologie des Stéroides de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Hôpital de Bicêtre, 94 Bicêtre, en tant que Chargé de Recherches au C.N.R.S.

Je suis très heureuse de pouvoir exprimer ici à Monsieur le Professeur Baulieu toute ma gratitude pour m'avoir confié ce sujet et m'avoir guidée avec sollicitude tout en me laissant une grande liberté d'initiative. Qu'il me permette de lui exprimer mon sincère attachement.

Madame A. Alfsen, Maître de Recherches au C.N.R.S., Equipe de Recherche des Etats Liés Moléculaires, 45 rue des Saints-Pères, Paris, a dirigé ce travail. Il m'est difficile de pouvoir exprimer tout ce que je dois à Madame Annette Alfsen. Son amicale soutien m'a constemment encouragée dans mon travail. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour l'énergie et la grande rigueur scientifique qu'elle n'a cessé de me prodiguer et pour l'intérêt constant qu'elle a apporté à la réalisation et à la rédaction de ce travail,qu'elle me permette de lui exprimer ici mon affectueuse gratitude.

Je voudrais remercier Monsieur le Professeur J. Tonnelat du grand honneur qu'il me fait en acceptant de faire partie de mon Jury d'examen de cette thèse. Je tiens

à l'assurer de ma vive gratitude pour sa gentillesse naturelle pour ses conseils et nombreuses critiques constructives.

Je suis également reconnaissante à Monsieur le Professeur H. Clauser d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'accepter de faire partie du Jury de Thèse. Je le prie de trouver ici l'expression de ma reconnaissance pour les nombreuses critiques et suggestions qu'il m'a apportées.

Je voudrais remercier le Docteur F. Franks pour la généreuse hospitalité avec laquelle il m'a accueillie dans son laboratoire. J'aimerais également remercier ses collaborateurs, MM. A. Flook et E. Finer pour leur aide précieuse dans les expériences de résonance magnétique nucléaire.

Je tiens à remercier Madame Michelle Vassal qui a assuré avec gentillesse et efficacité la dactylographie du manuscrit.

PUBLICATIONS

- H. Weintraub, A. Alfsen et E.E. Baulieu : "Etude de la $\Delta_{5\rightarrow4}$-3-oxostéroide isomérase. Caractéristiques des groupes impliqués dans le transfert de protons". Eur. J. Biochem. (1970), 12, 217.

- H. Weintraub, E.E. Baulieu and A. Alfsen : "Studies on $\Delta_{5\rightarrow4}$-3-oxosteroid isomerase. III Effect of solvent on the enzymatic proton transfer reaction". Biochem. Biophys. Acta (1972), 258, 655.

- F. Vincent, H. Weintraub and A. Alfsen : "Conformation of native Pseudomonas Testosteroni $\Delta_{5\rightarrow4}$-3-oxosteroid isomerase". FEBS Letters (1972) Juin ou Juillet.

- M. Hospital, B. Busetta, R. Bucourt, H. Weintraub and E.E. Baulieu : "X-Ray cristallography of estrogens and binding to receptor sites". Molecular Pharmacology (1972), Juillet.

TABLE DES MATIERES

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

	Pages
Quelques données sur l'isomérase	1 - 5
Introduction	6 - 9
PREMIERE PARTIE	
- Purification de la $\Delta_{5\rightarrow4}$ 3-oxostéroide isomérase de Pseudomonas testosteroni	10 - 21
- Etude de la conformation de l'isomérase	
Chapitre I	
Spectrophotométrie d'absorption	23 - 39
Chapitre II	
Spectrofluorométrie. Etude des chromophores intrinsèques de l'isomérase	40 - 50
Chapitre III	
Etude de l'isomérase par dichroisme circulaire	51 - 56
Chapitre IV	
Résonance magnétique nucléaire de l'isomérase	57 - 61
Chapitre V	
Sous-unités de l'isomérase	62

Chapitre VI

Caractéristiques structurales de l'isomérase liées à son contenu en amino-acides 63 - 69

DEUXIEME PARTIE

Contribution à l'étude du mécanisme d'isomérisation de la Δ^5 et $\Delta^{(5,10)}$ 3-oxo-stéroides par l'isomérase de Pseudomonas testosteroni

Chapitre I

Cinétique d'isomérisation au pH optimum 70 - 83

Chapitre II

Groupes impliqués dans l'activité enzymatique 84 - 101

Chapitre III

Interaction ternaire stéroide-protéine-solvant 102 - 130

Chapitre IV

Analogie entre la protéine du "Récepteur" utérin et l'isomérase pour les oestrogènes 131 - 134

CONCLUSION 135

BIBLIOGRAPHIE 136 - 145

QUELQUES DONNEES SUR L'ISOMERASE.

La $\Delta_{5\rightarrow 4}$3-oxostéroide isomérase de Pseudomonas testosteroni (E.C. 5.3.3.1, désignée dans ce travail comme isomérase) a été découverte et purifiée par Wang et Talalay (1). Inductible par la testostérone et la progestérone qui constituent la seule source en Carbone de la bactérie ; l'enzyme isomérise les $\Delta^{5(6)}$ et $\Delta^{5(10)}$-3-oxostéroides en Δ^{4}-3-oxostéroides correspondants. L'isomérase ne possède pas de groupe prosthétique ni de co-enzyme. A vitesse maximum, une mole d'isomérase transforme 17 x 10^{6} moles de Δ^{5}-androstène-3,17-dione par minute, dans des conditions standard que nous définirons plus tard ; sa vitesse spécifique moléculaire est donc très élevée. Cette réaction d'isomérisation se fait par un processus de transfert de proton intra-moléculaire. L'atome d'hydrogène est transféré de la position $C_4\beta$ axiale, vers la position $C_6\beta$ axiale. La démonstration (2) en a été faite par l'utilisation d'un substrat, le 17β-hydroxy-androstène-3,17-dione marqué par du deuterium dans la position $C_4\beta$ axiale. Après isomérisation du substrat, le deuterium a été détecté en $C_6\beta$ axial, dans la testostérone (produit de la réaction) ; lorsque

le deuterium est en $C_4\alpha$, on ne le retrouve pas dans le produit de la réaction. Ringold (2) a déterminé les différentes constantes de vitesse et a montré que l'étape limitante dans la réaction d'isomérisation était la perte de proton en $C_4\beta$. Il n'y a pas d'échange de proton avec le milieu. Des études faites en présence d'eau deuterée ne montrent pas d'incorporation de deuterium dans le produit de la réaction. Il n'y a pas d'échange de protons entre deux substrats différents. En effet, dans un mélange de concentration équimoléculaire de Δ^5-androstène-3,17-dione marquée en 4,4' avec du deuterium, et du 17α-méthyl-17β-hydroxy-Δ^5-androstène-3,17-dione non marqué, après isomérisation, on ne retrouve le deuterium que dans le Δ^4-androstène-3,17-dione. La présence de deuterium a été détectée par spectrophotométrie infrarouge dans la région 2255 et 2140 cm^{-1}.

Trois inhibiteurs compétitifs de l'isomérisation de la Δ^5-androstène-3,17-dione ont été décrits (3) : l'oestradiol (O_{II}), la 17β-dihydroéquilenine et la 19-nor-testostérone. Ces inhibiteurs ont tous une constante d'inhibition (Ki) voisine et de l'ordre de $5x10^{-6}$M en 3,3 % de méthanol.

L'interaction de ces inhibiteurs compétitifs a été étudiée par spectrophotométrie d'absorption U.V. et par

spectrofluorométrie. La formation de complexe ligand-isomérase se manifeste par des modifications dans les spectres d'absorption et de fluorescence du ligand et de l'enzyme.

Une étude détaillée avec la 19-nor-testostérone montre que la formation du complexe entraîne un effet bathochrome de 10 nm dans le spectre d'absorption de la 19-nor-testostérone. En mesurant l'extinction de fluorescence de l'isomérase par interaction avec la 19-nor-testostérone ces auteurs montrent (3) que trois sites d'interaction sont impliqués dans le complexe enzyme-stéroide. L'utilisation des stéroides phénoliques tels que l'oestradiol et la 17β-dihydroéquilenine, a permis de mettre en évidence que dans la formation du complexe enzyme-stéroide à pH neutre, les spectres d'absorption de ces stéroides ressemblaient à ceux que l'on obtiendrait par l'ionisation de groupes phénoliques de ces stéroides. D'où l'hypothèse de l'existence d'un énol comme étape intermédiaire dans la réaction enzymatique.

La séquence primaire de l'isomérase est connue. La composition totale de 388 résidus d'amino-acides de la chaîne polypeptidique de poids moléculaire 41.357 a été déterminé par J. Boyer (4). Il a également déterminé le tétrapeptide qui constitue la séquence de l'extrémité terminale en NH_2: Met-Asp-Thr-Pro.Talalay vient de publier l

séquence primaire complète de l'isomérase (5), comprenant 125 résidus d'amino-acides pour une sous-unité de 13.600. Cette séquence est donnée sur le tableau I. On y retrouve le tétrapeptide NH_2 terminal déjà déterminé par J. Boyer; le carboxyle terminal étant l'alanine. Cependant quelques discordances y sont à noter: l'isomérase contient 375 résidus d'amino-acides, l'acide aspartique du tétrapeptide NH_2 terminal est une asparagine. Le tableau II donne la composition en amino-acides de l'isomérase. L'isomérase a ceci de particulier qu'elle ne contient ni cystéine, ni ponts disulfures, ni tryptophane. Il y a 9 tyrosines et 24 phénylalanines pour un poids moléculaire de 40.800 $\pm$ 5 %.

La concentration en isomérase pure est déterminée par son $E^{1\%}_{1cm}$ à 280 nm, qui est de 4,13 (1).

Le poids moléculaire de l'isomérase a été déterminé selon Archibald (6). Une valeur de 39.800 au ménisque et de 41.700 au fond de la cellule ont été calculées (7) pour un volume partiel spécifique calculé de 0,734 ml/g, en supposant la densité du milieu égale à 1. Le coefficient de sédimentation $S^{20°}_W$ pour 4,6 mg/ml d'isomérase, est de 3,3 unités Svedberg et le coefficient de friction f/f_o 1,3. L'isomérase est très

TABLEAU I

Séquence primaire de l'isomérase pour une sous unité de poids moléculaire de 13.600.(5)

Met.	Asn.	Thr.	Pro.	Glu.	His.	Met.	Thr.	Ala.	Val.
1				5					10
Val.	Gln.	Arg.	Tyr.	Val.	Ala.	Ala.	Leu.	Asn.	Ala.
11				15					20
Gly.	Asn.	Leu.	Asn.	Gly.	Ile.	Val.	Ala.	Leu.	Phe.
21				25					30
Ala.	Asp.	Asn.	Ala.	Thr.	Val.	Glu.	Asn.	Pro.	Val.
31				35					40
Gly.	Ser.	Glu.	Pro.	Arg.	Ser.	Gly.	Thr.	Ala.	Ala.
41				45					50
Ile.	Arg.	Glu.	Phe.	Tyr.	Ala.	Asn.	Ser.	Leu.	Lys.
51				55					60
Leu.	Pro.	Leu.	Ala.	Val.	Glu.	Leu.	Thr.	Glx.	Glx.
61				65					70
Val.	Arg.	Ala.	Val.	Ala.	Asn.	Gln.	Ala.	Ala.	Phe.
71				75					80
Ala.	Phe.	Thr.	Val.	Ser.	Phe.	Glu.	Tyr.	Gln.	Gly.
81				85					90
Arg.	Lys.	Thr.	Val.	Val.	Ala.	Pro.	Ile.	Asp.	His.
91				95					100
Phe.	Arg.	Phe.	Asn.	Gly.	Ala.	Gly.	Lys.	Val.	Val.
101				105					110
Ser.	Met.	Arg.	Ala.	Leu.	Phe.	Gly.	Glu.	Lys.	Asn.
111				115					120
Ile.	His.	Ala.	Gly.	Ala.					
121				125					

TABLEAU II

Composition en acides aminée de l'isomérase par mole de poids moléculaire 40.800 ± 5 % (5)

Acides aminés	Nombre entier de résidus/mole
Asparagine	30
Acide aspartique	6
Thréonine	21
Sérine	15
Proline	15
Glutamine	9
Acide glutamique	21
Glycine	27
Alanine	63
Valine	42
Méthionine	9
Leucine	24
Isoleucine	12
Tyrosine	9
Phénylalanine	24
Lysine	12
Arginine	21
Histidine	9
Glux.*	6
TOTAL	375

Glux.* On ne sait s'il s'agit de glutamine ou d'acide glutamique.

stable à la température ordinaire. Ces auteurs ont également déterminé par titrage spectrophotométrique sur la protéine native, le nombre des tyrosines présentes et leur pK d'ionisation. La courbe est biphasique. 4 tyrosines s'ionisent avec un pK de 9,8, et les 5 tyrosines restantes s'ionisent à un pK supérieur à 12 (7).

L'isomérase contient 33 lysines + arginines ; les liaisons peptidiques adjacentes à ces résidus sont susceptibles d'être coupées par la trypsine, et on devrait obtenir au plus 34 peptides si toutes ces liaisons étaient coupées. Cependant Talalay et Boyer (8)ont obtenu par hydrolyse trypsique seulement 11 peptides différents et non 33. La somme de ces onze peptides en résidus amino-acides était de 122. Ce chiffre est très voisin du tiers du nombre des résidus de l'isomérase (5). Chacune des chaînes polypeptidiques constituée par ces 122 résidus amino-acides avait le même COOH et NH_2 terminal. D'autre part ces onze peptides isolés étaient suffisants pour la reconstitution totale en amino-acides de l'isomérase.

Ces différents résultats ont suggéré à Talalay et à Boyer que l'isomérase était un trimère constitué par trois sous-unités identiques. C'est sur cette base que Talalay a déterminé par analyse chimique la séquence primaire d'une sous-unité de l'isomérase.

INTRODUCTION

L'isomérase bactérienne a été choisie comme protéine modèle pour l'étude des interactions protéine-petites molécules possédant une activité biologique. Dans ce travail ces molécules sont des hormones stéroides. L'isomérase bactérienne qui, comme nous l'avons vu, peut être obtenue pure et cristallisée, et est active sans coenzyme, nous servira de point de comparaison pour l'étude de l'isomérase de mammifère extraite de surrénale de boeuf. L'enzyme effectue la même réaction de transfert de proton sur des substrats identiques (9).

Cette enzyme est particulaire et sa régulation est très complexe.

Chez les mammifères l'isomérase a un rôle biologique important. Dans le foie elle intervient dans la transformation du cholestérol en sels biliaires, voie métabolique de détoxication importante. Un à deux grammes de cholestérol est ainsi éliminé quotidiennement. De plus, l'isomérase est impliquée dans la biosynthèse des hormones stéroides. On a démontré avec des traceurs radioactifs que les stéroides hormonaux des glandes endocrines

étaient formés à partir du cholestérol (10). De nombreux systèmes enzymatiques participent à cette biosynthèse (11). La prégnènolone est le premier stéroide formé à partir du cholestérol. La formation de la testostérone à partir de la prégnénolone est schématisée sur la figure 1.

L'action de l'isomérase est toujours consécutive à celle de la 3β-hydroxystéroide oxydoréductase, appelée dans le schéma de la figure 1 "3β-ol-deshydrogénase complex", car les Δ^5 stéroides hydroxylés en 3 ne sont pas des substrats de l'isomérase.

Il existe d'autre part une certaine analogie entre le Récepteur cytosolique utérin et l'isomérase (12). Un très grand nombre de stéroides oestrogènes sont des analogues de substrat de l'isomérase, et se lient également sur le récepteur utérin cytosolique, qui n'a pas encore été purifié. L'isomérase bactérienne nous est donc apparue comme un système simple et bien défini, pouvant servir de modèle pour l'étude des interactions protéine stéroide chez les mammifères.

Le but du travail exposé est d'apporter des informations sur la conformation de la protéine modèle et les transitions conformationnelles qu'elle subit quand elle lie spécifiquement les stéroides hormonaux, ou des composés qui ont une activité biologique analogue comme le

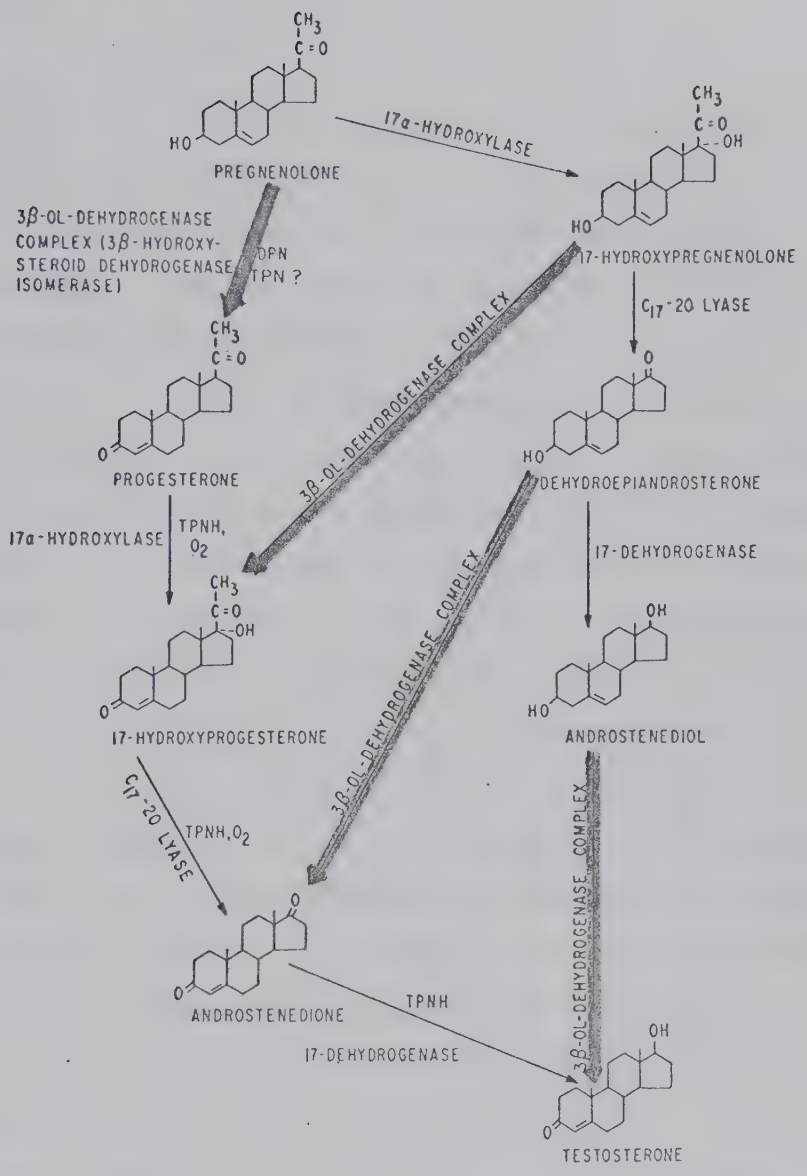


Figure 1 : Conversion de la prégnènolone en testostérone (11).

diéthylstilboestrol, qui sont des substrats ou des inhibiteurs compétitifs de l'isomérase.

Ces molécules de stéroides de caractère fortement apolaire, joueront un rôle modificateur dans les interactions hydrophobes de la protéine, et tendront à diminuer le coût thermodynamique de l'exposition de ces groupes hydrophobes au milieu aqueux environnant. Le solvant sera à son tour modifié. De nombreux faits tendent à prouver que le milieu aqueux n'est pas un solvant inerte mais qu'il joue un rôle essentiel dans les processus biologiques (13). Le concept d'interactions hydrophobes est un bon exemple du rôle joué par l'eau. Les énergies libres d'interaction pour les acides aminés apolaires favorisent leur regroupement à l'intérieur de la molécule protéique, les acides aminés polaires restent en contact avec le milieu aqueux environnant en formant des liaisons hydrogène.

Nous essayerons d'intégrer dans nos études l'eau, environnement unique de toute réaction biologique, en tenant compte non seulement des transitions conformationnelles des chaînes polypeptidiques liées aux interactions, mais aussi les transitions ordre-désordre associées au solvant en relation avec l'accommodation des molécules non polaires (stéroides) ou des groupes hydrophobes de la protéine dans le solvant aqueux.

Ce travail comportera donc : la purification de l'isomérase, l'étude de sa conformation native et des transitions conformationnelles dans différentes conditions, l'étude cinétique de l'isomérase en présence et en absence d'analogues des substrats, la caractérisation du site actif.

P R E M I E R E P A R T I E

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

PURIFICATION DE LA $\Delta_{5 \rightarrow 4}$ 3-OXOSTEROIDE ISOMERASE DE PSEUDOMONAS TESTOSTERONI (E.C. 5.3.3.1)

L'isomérase est préparée à partir des cultures de Pseudomonas Testosteroni. Ces cultures effectuées au laboratoire Roussel-UCLAF, permettent d'obtenir à partir de 100 litres, 100 g de poudre acétonique lyophilisée. On obtient à partir de ce matériel 10 à 15 mg d'isomérase pure.

Extraction de l'isomérase à partir de 100 g de poudre acétonique.

La purification de l'isomérase a été effectuée d'après la méthode de Talalay et Boyer (14) que nous avons modifiée.

Toutes les étapes de la purification sont effectuées à + 4°C. Les centrifugations sont effectuées à l'aide d'une centrifugeuse Spinco modèle L-2 65 B et d'une MSE.

Les différentes étapes de la purification sont :

I - Extraction de la poudre acétonique et obtention d'un surnageant S.

- Extraction de l'isomérase par l'éthanol à 95 % et le tampon Tris HCl 0,02 M, pH 7,2. Dans un becher contenant de l'éthanol, on ajoute progressivement sous agitation magnétique les 100 g de poudre acétonique et l'éthanol jusqu'à un litre. La suspension est agitée pendant 45 minutes. A cette suspension on ajoute un litre de tampon Tris HCl et on laisse l'agitation pendant 4 h 30.

- Le mélange obtenu est centrifugé à 20.000xg pendant 30 minutes. On recueille un surnageant jaune clair S_1, qui contient 90 % de l'isomérase, et un précipité P_1 qui en contient encore 10 %.

- Une deuxième extraction est effectuée sur P_1, identique à la première avec un demi volume d'éthanol et de Tris HCl. On obtient un surnageant S_2. S_1 et S_2 sont réunis, on obtient le surnageant S.

II - Adsorption de S sur gel de phosphate de calcium.

- Préparation du gel.

Dans un becher on ajoute sous agitation magnétique dans l'ordre :

PO_4HNa_2	0,5 M	200 ml
NH_4OH	concentré	6 ml
Cl_2Ca	0,1 M	1500 ml

Ce mélange précipite. Le pH de la suspension est mesuré à l'aide d'un indicateur de pH, il est voisin de 7,0. Cette suspension est lavée à l'eau bidistillée sur un büchner. Le gel recueilli sur le büchner est resuspendu dans 600 ml d'éthanol à 66 % (v/v).

- Adsorption du surnageant sur ce gel.

A un litre de surnageant on ajoute dans l'ordre sous agitation magnétique :

Cl_2 Mg 1M	15,8 ml
éthanol absolu	477 ml
eau bidistillée	26 ml
gel de phosphate	78 ml

On laisse l'agitation pendant une heure, puis le mélange est décanté toute la nuit.

- Séparation du surnageant et du précipité.

Le surnageant orange clair est siphoné au maximum avec la trompe à eau.

Il contient moins de 1 % de l'activité totale. On garde le précipité, après avoir éliminé totalement le surnageant par centrifugation à 10.000xg pendant 20 minutes. Ce précipité G contient l'isomérase et les autres protéines.

III - Mise en solution de l'isomérase à partir du précipité G.

Le précipité G est suspendu dans le minimum de tampon phosphate de potassium 0,03 M, pH 7,0. On agite une heure sous agitation magnétique, puis on centrifuge à 10.000xg pendant 30 minutes.

Le surnageant G_1 contient 70 % de l'activité totale. Une deuxième extraction identique à la première est effectuée. On obtient G_2, qui contient presque toute l'activité restante. Les extractions sont poursuivies tant que l'activité spécifique des fractions obtenues reste constante. Les fractions G sont réunies.

IV - Concentration de la fraction G.

Le volume de G étant trop important, il est nécessaire de le concentrer pour les étapes ultérieures. Cette concentration est effectuée dans des sacs de dialyse, sous vide, contre du tampon phosphate 0,002 M à pH 7,0, ou avec un appareil à concentrer (appareil Diaflo), sous pression d'azote.

V - Chromatographie sur colonne de Biogel P_2.

Cette chromatographie a pour but d'éliminer les sels,

et d'amener la solution protéique à une force ionique correspondant à une molarité en phosphate de potassium qui n'excède pas 0,002 M.

On utilise une colonne (1,5 x 15 cm) de Biogel P_2 (Biorad), préalablement équilibrée avec du tampon phosphate 0,002 M, pH 7,0. L'élution est effectuée avec 100 ml du même tampon. Des fractions de 2 ml sont recueillies, les conductivités sont mesurées dans chaque fraction, ainsi que l'activité enzymatique. Les fractions actives, de molarité inférieure à 0,002 M (correspondant à une conductivité inférieure à 0,027 milliMhO) sont réunies (environ 10 ml).Cette colonne de P_2 ne dilue que très peu la solution protéique. D'autre part cette étape constitue une purification partielle. En effet une partie du colorant jaune reste adsorbée sur la colonne.

VI - Chromatographie sur DEAE-cellulose.

La DEAE-cellulose DE 11 (Whatman) a été préparée selon la méthode de Sober et al (15).

Elle a été équilibrée avec du tampon phosphate 0,002 M à pH 7,0. Les caractéristiques de cette colonne sont les suivantes : 1,8 x 20 cm, débit 1 ml par minute. 10 ml de la fraction après passage sur P_2 sont déposés sur la colonne. L'élution s'effectue à pH constant (pH 7,0)

par gradient discontinu en force ionique, réalisé avec des tampons phosphate de molarité croissante de 0,002 M à 0,1 M.

Des fractions de 4 ml environ sont recueillies. Le profil d'élution est montré sur la figure 2.

Les fractions les plus actives sont éluées entre 0,04 M et 0,06 M.

VII - Précipitation par le sulfate d'ammonium.

Les fractions de même activité spécifique sont réunies, et on y ajoute progressivement du sulfate d'ammonium solide (Mann Research ultra pur), jusqu'à 70 % de saturation à 20° C, avec correction continue de pH, réalisée par addition d'ammoniaque. On laisse le précipité se former toute la nuit.

On centrifuge le mélange à 20.000xg pendant 40 minutes. Le précipité obtenu est redissout dans du tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0. A cette solution on ajoute goutte à goutte, sous agitation magnétique, une solution de sulfate d'ammonium saturée à pH 7,0, jusqu'à l'apparition d'un trouble léger persistant.

Au bout de quelques semaines des cristaux d'isomérase apparaissent (quand la concentration en isomérase est voisine de 5 mg/ml). Cette cristallisation est répétée

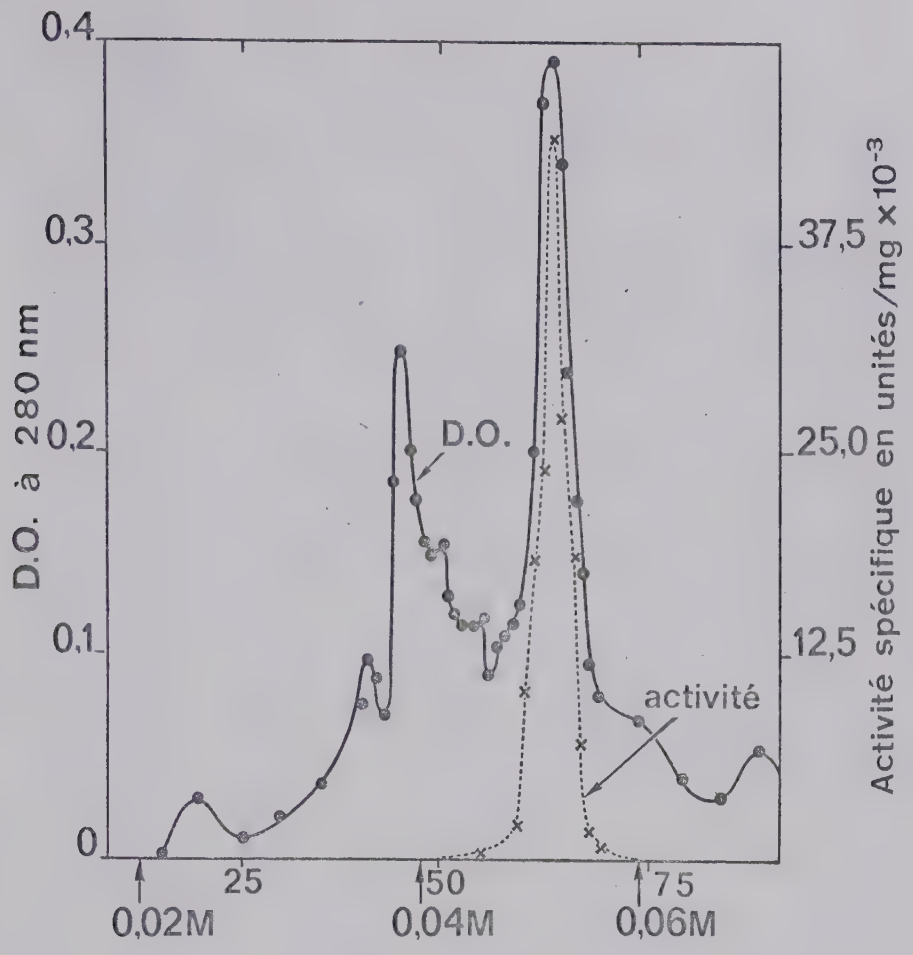


Figure 2 : Chromatographie de l'isomérase sur colonne de DEAE cellulose, l'élution se fait par gradient discontinu en force ionique. Des fractions de 4 ml sont recueillies. Température 4°C.

Courbe ● : D.O. à 280 nm (cuves de trajet optique 10 mm),

Courbe x : Activité spécifique en unités/mg, mesurée à 248 nm dans les conditions standard définies dans "Méthodes".

TABLEAU III

LES DIFFERENTES ETAPES DE PURIFICATION DE L'ISOMERASE

Les différentes étapes	volume en ml	concentration de protéines en mg/ml	Activité en u/ml	Activité totale	Activité spécifique en u/mg de protéine	Purification	Rendement
lère extraction S_1	1720	0,950	515	825.000	540		
2ème extraction S_2	860	0,048	105	90.000	540		
Fractions S réunies	2580	0,775	380	980.000	540		100 %
Eluats du gel de phosphate G_1	34,0	5,92	20.000	680.000	3380	6,25	
G_2	28,0	2,24	10.000	280.000	4450	8,25	98 %
Fractions les plus actives après élution sur colonne DEAE cellulose	4,95	0,9	40.500	200.000	52.500	97,5	
	28,0	0,835	23.000	646.000	30.000	55,5	86,5 %
Première précipitation par le $SO_4(NH_4)_2$ et extraction par du tampon phosphate 0,03 M, pH 7, on obtient 2 fractions	5,0	2,0	130.000	650.000	65.000	120	
	1,0	0,675	44.000	176.000			84,5 %
2ème précipitation par $SO_4(NH_4)_2$ (essai de cristallisation).	4,0	2,73	175.000	700.000	64.000	120	71,5 %

plusieurs fois, jusqu'à obtention des cristaux ayant une activité spécifique constante. En général 2 cristallisations successives suffisent. La figure 3 montre des cristaux d'isomérase avec un agrandissement de 64 . Ces cristaux sont orthorhombiques et se présentent en aiguilles allongées. On élimine le sulfate d'ammonium par équilibre de dialyse contre du tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0.

Les étapes principales de la purification sont résumées sur le tableau III.

L'activité spécifique et la concentration en protéines sont mesurées à chaque étape.

VIII - Mesures cinétiques.

a) Principe

Les 3-oxostéroides α-β insaturés présentent une bande d'adsorption caractéristique à 248 nm en solution aqueuse. L'absorption du substrat est négligeable à cette longueur d'onde . On suit donc par des mesures spectrophotométriques à 248 nm l'apparition des produits de la réaction, les Δ^4-3-oxostéroides, en fonction du temps. Les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz avec un spectrophotomètre enregistreur DB Beckman, à double faisceau pourvu d'un système thermostaté. La

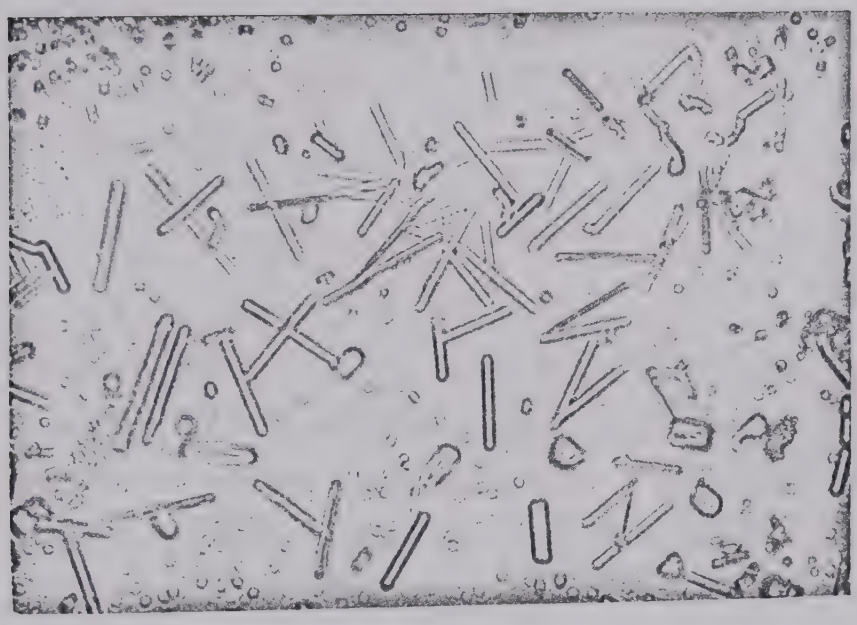


Figure 3 : Cristaux de l'isomérase, agrandissement 64.

température de la cuve est contrôlée pendant toute la durée de l'expérience à l'aide d'un thermo couple (Digital thermometer - Limited Systems Corporation Dayton, Ohio).

b) Définition de l'unité d'activité.

L'unité d'activité de l'enzyme est définie d'après Talalay (1) comme la quantité d'enzyme isomérisant 1 µmole de 5-androstènedione par minute à 25°C, pH 7,0, dans un système réactionnel de 3 ml contenant : 100 µmoles de tampon phosphate de potassium, 0,175 µmoles de 5-androstènedione, 0,05 ml de méthanol absolu (1,7 % v:v) et une quantité d'enzyme permettant la mesure (diluée dans de la sérum albumine de boeuf à 1 %, à pH 7,0).

c) Calcul de l'activité enzymatique.

L'absorbance d'une mole de Δ^4-androstènedione en solution aqueuse est de 16.300 à 248 nm. L'isomérisation de 1 µmole de 5-androstènedione dans 3 ml de solution correspond donc à une variation de la densité optique (ΔDO) par minute de 5,43.

L'activité exprimée en unités/ml est donnée par la relation :

$$\text{Act. en u/ml} = \left(\frac{\Delta DO \ 248 \text{ nm}}{\text{minute}} \right) \times d \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{5,43}$$

d est la dilution de l'enzyme,
V est le volume exprimé en ml de l'enzyme ajouté.
Dans les préparations utilisées, nous avons trouvé une activité spécifique de l'isomérase d'environ 60.000 u/mg de protéine. Si l'on considère le poids moléculaire de l'isomérase égal à 40.800, une unité d'isomérase correspond à $4,10 \times 10^{-10}$ M.

IX - Mesure de la concentration en isomérase.
Méthode de Lowry (16).

C'est un dosage colorimétrique, et la densité optique que l'on mesure à 750 nm est proportionnelle au contenu en acides aminés aromatiques (tyrosines et tryptophanes) dans le mélange protéique.

Cette mesure de la concentration protéique donne donc des résultats assez approximatifs, car on se réfère à une courbe étalon établie avec une protéine de référence : la sérum albumine de boeuf, qui a une certaine composition en acides aminés aromatiques, qui n'est pas du tout la même que celle de l'isomérase ; néanmoins, elle permet de suivre la purification, et on obtient des résultats qui sont assez cohérents.

Les réactifs utilisés sont les suivants :

Réactif I : CO_3Na_2 2 % dans du NaOH 0,1 N

Réactif II : SO_4Cu ($5H_2O$) 0,5 % dans du tartrate de sodium et du potassium 1 % .

Réactif III : Folin-Ciocalteu (Merck), dilué volume à volume dans l'eau bidistillée.

Réactif IV : Mélange de 50 ml de I + 1 ml de II.

Dans 0,5 ml d'une solution protéique de 0,02 à 0,2 mg/ml on ajoute 2,5 ml du mélange III, on agite, puis on laisse la solution se reposer 10 minutes. On ajoute alors 0,2 ml de réactif III (Folin 1/2), on agite, puis on laisse le mélange 30 minutes. On mesure alors la densité optique à 750 nm. On détermine la concentration de la protéine en se rapportant à la courbe étalon établie simultanément avec la sérum-albumine de boeuf.

X - Critères de pureté.

L'homogénéité de la préparation est vérifiée par son activité spécifique, constante après plusieurs cristallisations (60.000 unités/mg de protéine) , son spectre U.V. caractéristique (figure 4) ; l'ultra-centrifugation analytique où l'on observe un pic symétrique (figure 5), la migration électrophorétique sur cellogel (figure 6), où une bande unique est obtenue à plusieurs concentrations en protéines, et à des temps de migration différents.

Electrophorèse sur bandes de cellogel (Sébia).

A - Tampons d'électrophorèse :

1) Tampon véronal sodique pH 8,6

. Véronal sodique 9,8 g

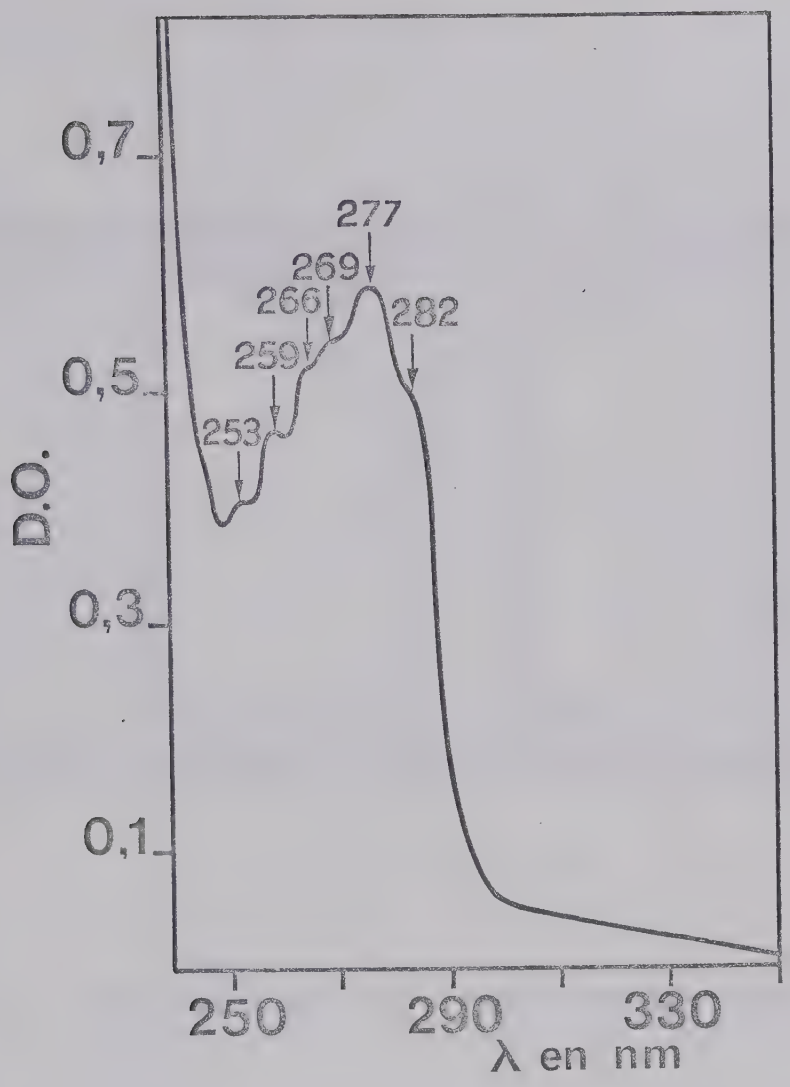


Figure 4 : Spectre d'absorption de l'isomérase purifiée (1,27 mg/ml, d'activité spécifique 64.000 u/mg) en tampon phosphate 0,03 M pH 7,0 à 25° C, trajet optique de la cuve 10 mm.

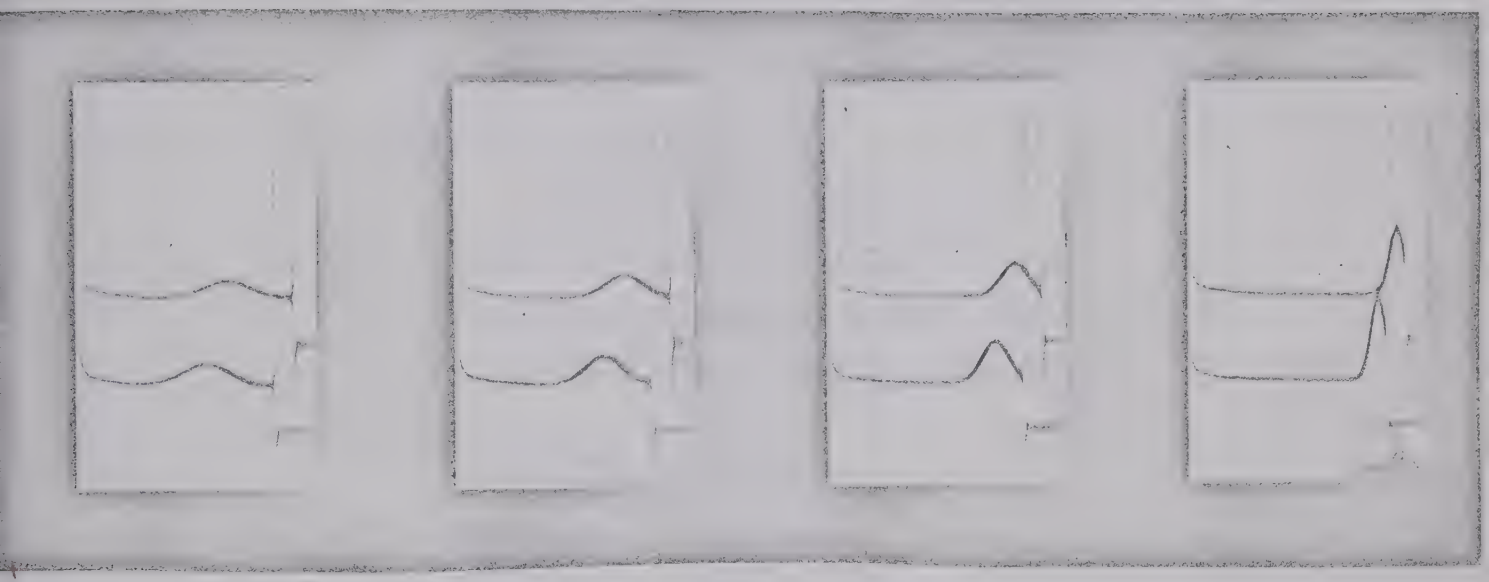


Figure 5 : Sédimentation de l'isomérase sur Spinco analytique modèle E.

. Système optique Schlieren. Vitesse de rotation 56.100 tours/minute à 20°C, inclinaison de la barre 60°.
. Photographies prises à 32, 64, 96 et 128 minutes.
. L'enzyme est dissout en tampon phosphate 0,03 M et KCl 0,1 M, à pH 7, à la concentration de 6,08 mg/ml (enregistrement supérieur) et 4,08 mg/ml (enregistrement inférieur).

. Acétate de sodium 6,48 g
. Acide chlorhydrique 0,1 N 60 ml
. Eau distillée 1000 ml.

2) Tampon acétate 0,02 M pH 5,2.

3) Mélange révélateur
. 0,5 g d'amidoschwarz
. 40 ml d'eau distillée
. 50 ml de méthanol (distillé)
. 10 ml d'acide acétique (concentré)

B - Mélange décolorant

Méthanol 35 volumes
Eau bidistillée 50 volumes
Acide acétique 7 volumes
Diacétonalcool 8 volumes.

Mode opératoire:

0,025 à 0,1 ml d'une solution protéique de concentration de 2 à 10 mg est déposée avec une lamelle de verre sur la bande de cellogel (2,5 x 17 cm) en acétate de cellulose, qui a été préalablement équilibrée avec du tampon pendant 30 minutes.

On laisse migrer l'isomérase de 30 à 90 minutes de la cathode (-) vers l'anode (+) sous 150 V, puis on révèle avec le mélange A pendant 30 secondes. On

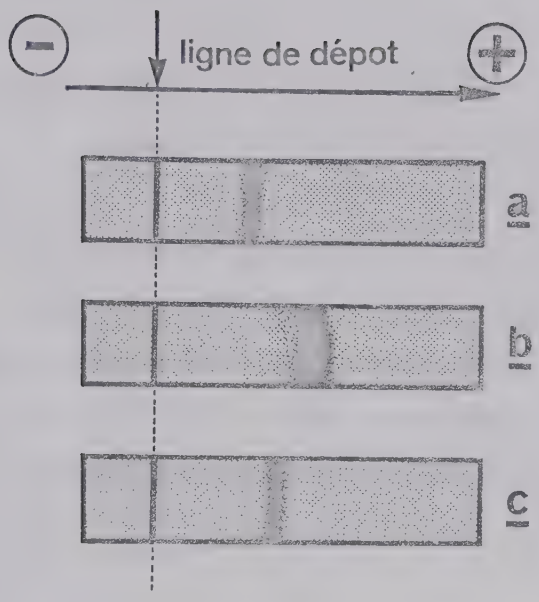


Figure 6 : Electrophorèse sur bande de Cellogel

a - 0,175 mg de protéine, temps de migration 30 minutes.

b - 3,5 mg de protéine, temps de migration 90 minutes.

c - 0,87 mg de protéine, temps de migration 70 minutes.

décolore avec le mélange B, et on plastifie les bandes à 60° C. La figure 6 montre une électrophorèse sur cellogel pour l'isomérase pure d'activité spécifique 64.000 u/mg, après chromatographie sur DEAE cellulose Whatman 11. Dans cette première partie nous avons décrit la purification de l'isomérase, et l'homogénéité du matériel obtenu par différents critères de pureté. Cette protéine dont la préparation est simple a cependant un très faible rendement. Nous avons donc choisi pour son étude des techniques physicochimiques qui ne nécessitent pas des concentrations importantes en protéine, exception faite pour la résonnance magnétique nucléaire.

ETUDE DE LA CONFORMATION DE L'ISOMERASE

ETUDE DE LA CONFORMATION DE L'ISOMERASE

Différentes techniques ont été utilisées pour l'étude de la conformation et des transitions conformationnelles de l'isomérase en solution.

Chapitre I - Spectrophotométrie d'absorption.

Chapitre II - Spectrofluorométrie des chromophores intrinsèques.

Chapitre III - Dichroïsme circulaire (D.C.).

Chapitre IV - Résonance magnétique nucléaire.

Chapitre V - Sous unités de l'isomérase.

Chapitre VI - Caractéristiques structurales de l'isomérase liées à son contenu en amino-acides.

CHAPITRE I

SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION

Généralités

L'absorption de la lumière par les protéines dans la région ultra-violette du spectre entre 250 et 300 nm est essentiellement due aux transitions électroniques de résidus d'amino-acides aromatiques des chaînes latérales, tryptophanes, tyrosines et phénylalanines. Les bandes d'absorption de la phénylalanine et de la tyrosine correspondent probablement à des transitions électroniques $\pi \longrightarrow \pi^*$, celles du tryptophane à deux transitions indépendantes, l'une $\pi \longrightarrow \pi^*$ et l'autre moins importante $n \longrightarrow \pi^*$(17). A des longueurs d'onde plus faibles il y a également une contribution des résidus

histidines, cystéines, et dans l'U.V. lointain, de la liaison peptidique (18,19,20,21).

- L'intensité maximum et la forme des bandes d'absorption permettent de distinguer, en absence de tryptophane, les 2 chromophores tyrosines et phénylalanines.

- Au pH voisin de la neutralité les caractéristiques spectrales de ces 3 chromophores sont :

Chromophores	E_M (max)	λ en nm
tryptophane	5500	278,0
tyrosine	1340	274,5
phénylalanine	195	257,5

Une protéine présente en général une hyperchromicité et un déplacement bathochrome par rapport au mélange de ses constituants d'amino-acides chromophores.

Ces modifications spectrales peuvent résulter d'un changement de l'environnement du chromophore dans une protéine par rapport au composé modèle dû à plusieurs effets :

- Présence du squelette peptidique ;

- Interactions des chromophores avec des résidus voisins ou éloignés dans la chaîne polypeptidique ;

- Changement de l'indice de réfraction du milieu. L'augmentation de l'indice de réfraction produit un effet bathochrome.

- Formation des liaisons hydrogène . Les phénols non ionisés des tyrosines et les carboxyles et imidazoles ionisés peuvent contracter des liaisons hydrogène produisant un effet d'ionisation partielle des tyrosines donnant des ions phénolates; il en résulte un effet bathochrome.

- Effets électrostatiques : l'effet d'une charge positive ou négative proche du chromophore peut affecter son spectre d'absorption.

L'effet global peut résulter de la participation de plusieurs causes simultanées.

A - Données spectrophotométriques de l'isomérase

Dans le cas de l'isomérase qui n'a pas de tryptophane ce ne seront donc que des transitions $\pi \longrightarrow \pi^*$ qui seront responsables des bandes d'absorption en U.V.

a) Caractéristiques spectrales de l'isomérase (en solution aqueuse, à pH 7,0 en tampon phosphate de potassium 0,03 M et à 22 $\pm$ 0,5 ° C).

L'absence de tryptophane dans la molécule d'isomérase donne un spectre d'absorption avec une grande résolution, où les pics de phénylalanines peuvent être

nettement distingués car ils ne sont pas masqués par le tryptophane (figure 4). 4 pics de la phénylalanine peuvent être distingués : à 253, 259, 266 et 269 nm, on observe un minimum à 250 nm. 2 maxima dûs aux tyrosines, l'un à 277 nm (λ maximum) et un épaulement à 282 nm apparaissent. Le spectre d'absorption en U.V. de l'isomérase reflète donc son contenu en tyrosines et phénylalanines.

Le coefficient d'extinction molaire de l'isomérase à 280 nm (qui n'est pas la longueur d'onde correspondant au maximum de l'absorbance) est $E_M = 1,68 \times 10^4$ litre x $cm^{-1} M^{-1}$. Il correspond à l'absorbance d'une mole d'isomérase de poids moléculaire de 40.800 . Le maximum d'absorbance a lieu à 277 nm. Cependant pour comparer nos résultats à ceux de Talalay la concentration de l'isomérase est mesurée à 280 nm.

b) Comparaison de l'isomérase native à son composé modèle.

Nous avons comparé le spectre d'absorption de l'isomérase à celui d'un mélange d'amino-acides aromatiques ayant la même composition et la même concentration molaire que la protéine.

La figure 7 montre ces 2 spectres d'absorption :

Courbe (1) : protéine

Courbe (2) : composé modèle.

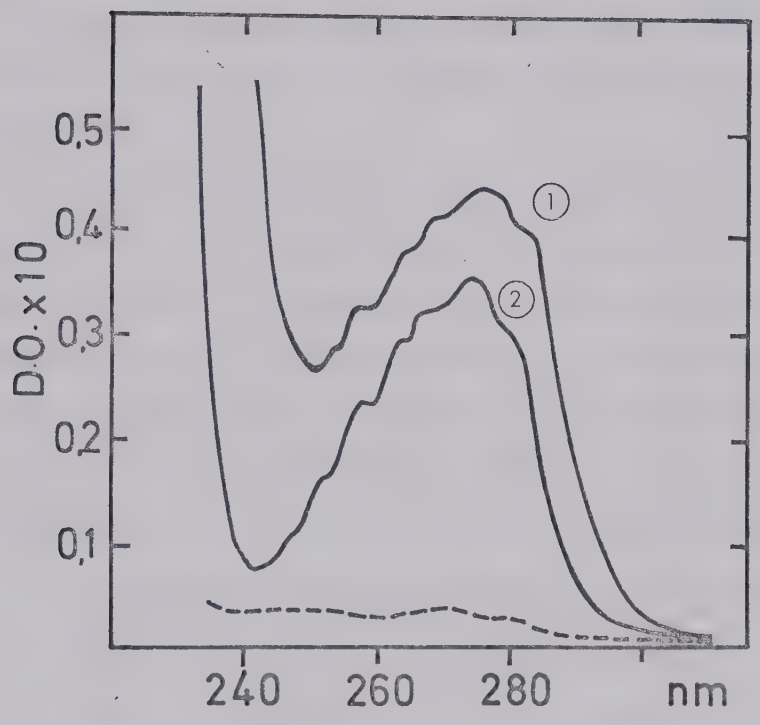


Figure 7 : Spectre d'absorption de l'isomérase à la concentration $2,38 \times 10^{-6}$ M, en tampon phosphate de potassium 0,03 M, pH 7,04 et à 22°C, enregistrement (1). Composé modèle enregistrement (2), correspond à 9 tyrosines et à 24 phénylalanines, soit : Tyrosines : $2,14 \times 10^{-5}$ M
Phénylalanines : $5,70 \times 10^{-5}$ M.

On remarque qu'à pH neutre, voisin de 7,0, l'absorbance de l'isomérase est plus grande que celle du composé modèle correspondant.

Cette hyperchromicité est très importante, elle est de l'ordre de 26 % dans la région des tyrosines ($\lambda \simeq$ 280 nm).

On observe d'autre part un déplacement bathochrome de 2 nm de l'isomérase par rapport au mélange de ses constituants. Le déplacement bathochrome des pics caractéristiques de l'isomérase, et l'hyperchromicité observée, peuvent être attribués au changement de l'environnement des chromophores dans la protéine par rapport au mélange de ses constituants aromatiques.

c) Influence de la charge au voisinage des chromophores tyrosines et phénylalanines.

Nous avons remplacé dans le composé modèle les amino-acides aromatiques libres par leurs dérivés éthyl ester. Le spectre d'absorption n'est pas modifié. Il semble donc que la charge du groupe carboxyle dans la même molécule de tyrosine n'est pas responsable des altérations spectrales observées (19). Cependant des expériences ultérieures avec des dipeptides contenant une tyrosine, pourront peut-être apporter des informations supplémentaires sur l'influence des interactions des groupes voisins sur le spectre d'absorption (19).

B - SPECTROPHOTOMETRIE DIFFERENTIELLE EN PRESENCE D'ALCOOL.

Mise en évidence de l'environnement hydrophobe des chromophores de l'isomérase.

Nous avons étudié le spectre de différence de l'isomérase contre le mélange modèle dans le même milieu solvant : tampon phosphate 0,03 M à pH 7,0. Nous avons également étudié le spectre de différence du même mélange modèle contre celui du mélange modèle en 60 % v/v d'éthanol.

Le principe de la méthode (22) consiste à enregistrer à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau la différence de l'absorbance d'une solution protéique par rapport à une autre solution protéique de concentration molaire identique, mais l'une différant de l'autre par certaines propriétés physiques du milieu environnant. Dans ce travail nous avons modifié la polarité du milieu des chromophores du composé modèle, par addition d'éthanol à 60 % v/v. On enregistre directement la différence d'absorbance entre les deux solutions, produite par cette modification. L'une des deux solutions constitue la solution de référence.

Matériel et Méthodes

- L'isomérase a une activité spécifique de 64.000 u/mg.

- La phénylalanine et la tyrosine sont des produits Calbiochem.

- L'éthanol est un produit Merck.

- Les cuves appariées sont en quartz à double compartiments, pour soustraire directement la contribution du solvant du spectre de différence. Chacun des compartiments a un trajet optique de 4.375 mm. Les enregistrements spectrophotométriques ont été effectués sur un spectrophotomètre enregistreur Bausch et Lomb Spectronic 505, et à la température ordinaire.

La figure 8 montre les deux cuves (A) et (B) avec leurs compartiments (1) et (2).

Les flèches indiquent le sens du faisceau lumineux.

1) Remplissage des cuves (A) et (B) pour l'enregistrement de la figure 9.

- Cuve de référence (A). Le compartiment (1) contient le tampon phosphate 0,03 M pH 7,0, le compartiment (2) contient le mélange tyrosines $1,65 \times 10^{-4}$ M, et phénylalanines $4,55 \times 10^{-4}$ M en tampon phosphate 0,03 M.

- Cuve de mesure (B). Le compartiment (1) contient le tampon phosphate 0,03 M pH 7, le compartiment (2)

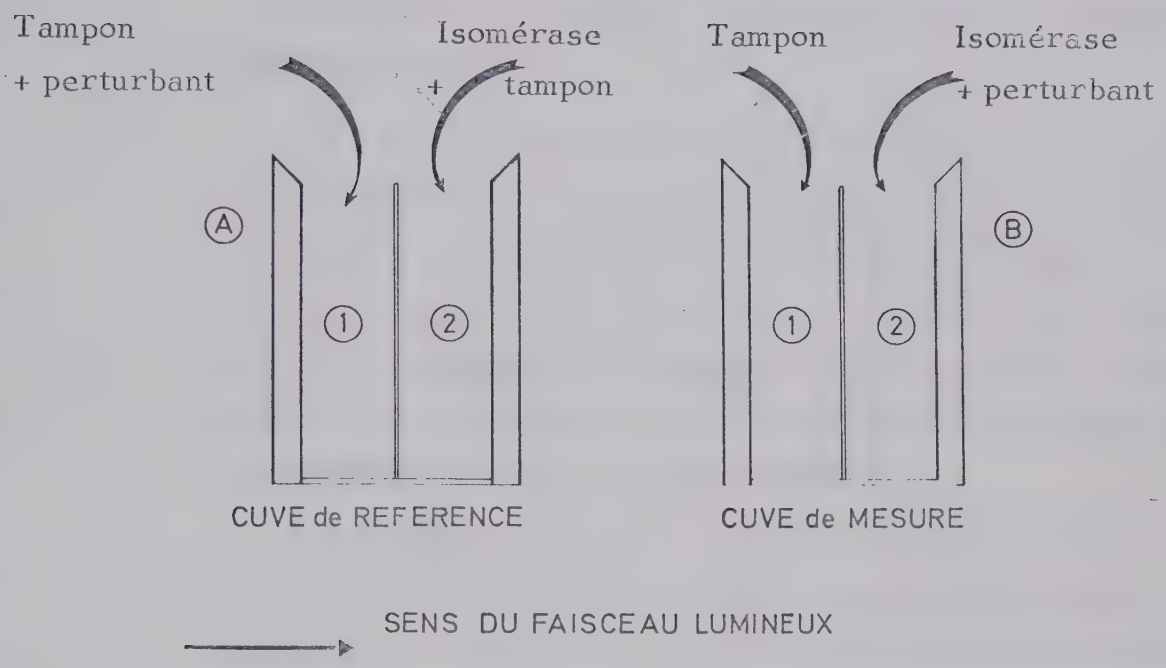


Figure 8 : Cuves à double compartiments.

contient l'isomérase 1,83 x 10^{-5} M en tampon phosphate 0,03 M.

Le faisceau lumineux traverse d'abord le tampon des deux cuves.

2) Pour l'enregistrement de la figure 10 l'isomérase est remplacée par son mélange modèle en 60 % v/v d'éthanol dans le compartiment (2) de la cuve de mesure ; dans le compartiment (1) de la cuve de référence on ajoute 60 % v/v d'éthanol en phosphate 0,03 M, pH 7,0. La ligne de base est enregistrée avec les deux cuves identiques. La référence est le mélange modèle.

La figure 9 montre un spectre de différence de l'isomérase par rapport au mélange modèle de ses constituants chromophores à la même concentration molaire.

La figure 10 donne le spectre de différence du mélange modèle par rapport au même composé modèle en éthanol 60 % v/v.

Une grande similitude des pics de différence apparait. Ils sont observés aux mêmes longueurs d'onde

	Protéine en nm	Composé modèle en nm
- pics dûs à la perturbation	286-288	286
des tyrosines	279	278
- pics dûs à la perturbation	270-266	264
des phénylalanines	260-254	260

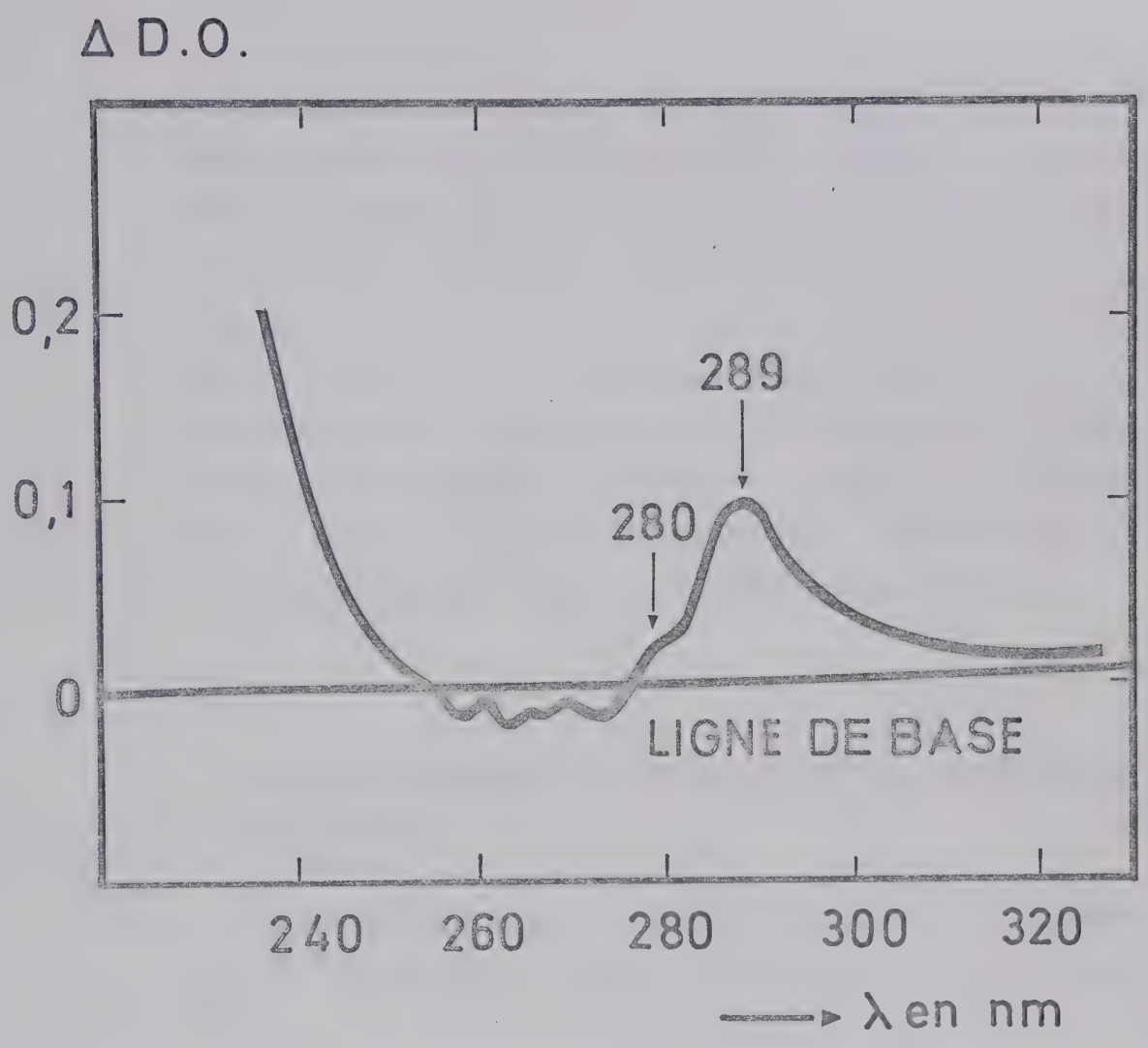


Figure 9 : Spectre de différence de l'isomérase par rapport à son composé modèle de même concentration molaire, en tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0 et à 22° ± 0,5° C.

La concentration de l'isomérase est de : $1{,}83 \times 10^{-5}$ M

La concentration de tyrosines est de : $1{,}65 \times 10^{-4}$ M

La concentration de phénylalanines est de : $4{,}55 \times 10^{-4}$ M

et sont caractéristiques de la perturbation de tyrosines et des phénylalanines et qui démontrent en même temps l'absence de tryptophane dans l'isomérase. Une hyperchromicité apparaît dans la figure 10 pour le mélange modèle dans un milieu plus apolaire (par l'addition d'éthanol). Nous avons pu ainsi réaliser un environnement plus hydrophobe des chromophores du mélange modèle, qui pourrait ressembler à celui de l'isomérase en solution tampon et expliquer l'hyperchromicité de l'isomérase par rapport au mélange modèle.

C - SPECTROPHOTOMETRIE DE DIFFERENCE EN PRESENCE DE PERTURBANT.

Cette méthode permet la localisation des chromophores, tyrosines et phénylalanines sur la protéine.

Principe :

Les spectres d'absorption dans l'ultra-violet de ces chromophores à la surface des protéines, donc "accessibles" au solvant sont perturbés par des modifications des propriétés physiques du solvant considéré. L'augmentation de l'indice de réfraction du

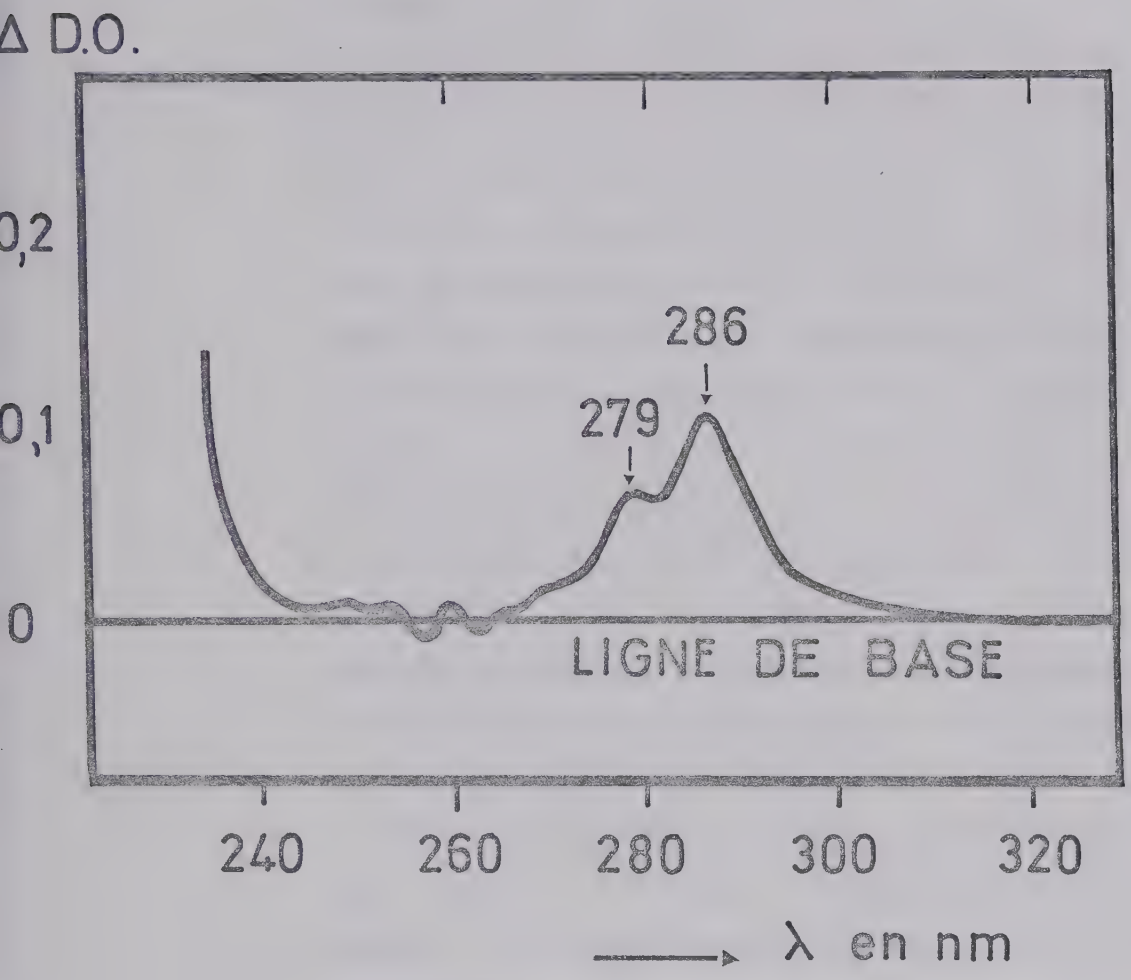


Figure 10 : Spectre de différence du composé modèle par rapport au même composé modèle en 60 % v/v d'éthanol en tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0 à 22° ± 0,5° C.

La concentration de tyrosines est de : $1,65 \times 10^{-4}$ M

La concentration des phénylalanines est de : $4,55 \times 10^{-4}$ M

solvant produit un effet bathochrome (23). Par contre les mêmes chromophores masqués à l'intérieur de la protéine, sont protégés de l'effet de l'agent perturbant et leur spectre d'absorption n'est pas altéré. Toutefois, le solvant ne doit pas produire de changement de conformation de la protéine. La distinction entre les chromophores complètement "inaccessibles" ou "masqués" et les chromophores "exposés" ou "accessibles" au solvant est une simplification. Des états intermédiaires existent. Les chromophores "masqués" ne sont pas forcément impliqués dans des interactions et ceux qui sont accessibles peuvent l'être. Les déplacements spectraux par solvants perturbants seraient dûs à des différences énergétiques entre l'état fondamental et l'état excité des chromophores solvatés.

Dans le cas des perturbants de petite taille (éthylène glycol) il s'agit d'interactions (24,25) à courte distance en comparaison des dimensions des molécules protéiques.

D'après la longueur d'onde à laquelle on observe les pics de différence, on peut présumer quels sont les chromophores perturbés.

Par spectrophotométrie de différence on estime la fraction des chromophores perturbés par rapport au nom-

bre total des chromophores dans la protéine. On peut utiliser soit la protéine complètement dénaturée, soit un mélange modèle de même contenu en amino acides que la protéine, afin que tous les chromophores soient au contact du solvant.

Dans ce travail nous avons choisi le composé modèle, constitué par un mélange d'amino-acides aromatiques ayant la même composition que la protéine.

Matériel et méthodes.

La technique utilisée est celle de Herskowits et Laskowski (26).

- La tyrosine et la phénylalanine sont des produits Fluka.

- L'éthylène glycol est un produit Merck, et il a été utilisé tel que.

Mesures spectrophotométriques.

La technique utilisée a été décrite pour les expériences en présence d'éthanol (pages 28-29-30).

Cuve de référence (A)

Le compartiment (1) contient 1,0 ml d'une solution d'éthylène glycol à 20 % en tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0.

Le compartiment (2) contient 0,8 ml d'isomérase prise dans une solution stock, et 0,2 ml de tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0.

Cuve de mesure (B)

Le compartiment (1) contient 1 ml de tampon phosphate 0,03 M à pH 7,0.

Le compartiment (2) contient 0,8 ml d'isomérase prise dans la solution stock, et 0,2 ml d'éthylène glycol donnant la même concentration finale en isomérase et en éthylène glycol que la cuve A.

Le faisceau lumineux traverse d'abord le blanc des deux cuves, soit : dans la cuve de référence, l'éthylène glycol à 20 %, et dans la cuve de mesure le tampon seul. Le même procédé de remplissage est utilisé avec le composé modèle.

On peut donc enregistrer un spectre de différence de la protéine en contact avec l'éthylène glycol à 20 %, qui perturbe les chromophores de la protéine, par rapport à une solution d'isomérase à la même concentration,mais non en contact avec le perturbant.

La ligne de base est enregistrée entre 230 et 320 nm.

Les cuves sont ensuite lavées et séchées à l'air comprimé pur. Pour éviter les erreurs de dilution on

utilise la même micropipette de précision de 200 µl (Misco), et la même pipette d'un ml, que l'on lave et que l'on sèche pour prélever les différentes solutions.

Les spectres de différence ont été enregistrés de 5 à 40 minutes après la préparation des solutions. Le pH a été vérifié avant et après les enregistrements. La température de l'expérience était de 19° $\pm$ 0,5 C. La concentration de la protéine a été déterminée d'après son $E^{1\%}_{1cm}$ à 280 nm.

Résultats

Détermination de la fraction des tyrosines et phénylalanines exposées. Cette fraction $F_{exp.}$ est donnée par le rapport :

$$F_{exp.} = \frac{(\Delta E_{prot.\ \lambda\ max} / E^{1\%}_{1cm\ prot.\ \lambda\ max})}{(\Delta E_{c.mod.\ \lambda\ max} / E^{1\%}_{1cm\ c.mod.\ \lambda\ max})}$$

$\Delta E_{prot.\ \lambda\ max}$ est l'absorbance du pic principal du chromophore considéré à la longueur d'onde λ du spectre de différence de la protéine en présence d'éthy-

lène glycol 20 %, $E^{1\%}_{1cm\ prot.\lambda\ max}$ est l'absorbance de l'isomérase au maximum d'absorption, 277 nm en tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0.

$\Delta E_{c.mod.\ \lambda\ max}$ est l'absorbance du pic principal du chromophore considéré à la longueur d'onde du spectre de différence du composé modèle dans le solvant perburbant; $E^{1\%}_{1cm\ mod.\lambda\ max}$ est l'absorbance du composé modèle au maximum d'absorbance (λ = 274 nm, et en tampon phosphate de potassium 0,03 M, pH 7,0).

La figure 11 montre le spectre de différence de l'isomérase en 20 % d'éthylène glycol. L'isomérase est à la concentration 4,50 x 10^{-5} M. La température est de 19 $\pm$ 0,5° C.

On y observe deux pics de perturbation caractéristiques des tyrosines, l'un à 287 nm le plus important, et l'autre à 278 nm, de ΔE 0,011 et 0,010, et six pics qui peuvent être attribués aux perturbations des phénylalanines : à 270, 260, 255, 251, 247 et 244 nm, de ΔE entre 0,006 et 0,003.

La figure 12 montre le spectre de différence du composé modèle correspondant à 9 tyrosines et 24 phénylalanines : tyrosines 4,05 x 10^{-4} M, phénylalanines 1,05 x 10^{-3} M. Température 19 $\pm$ 0,5° C, tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0.

On y observe deux pics de différence, l'un à 284,4 et l'autre à 277 nm, d'absorbance 0,018 et 0,0135, qui

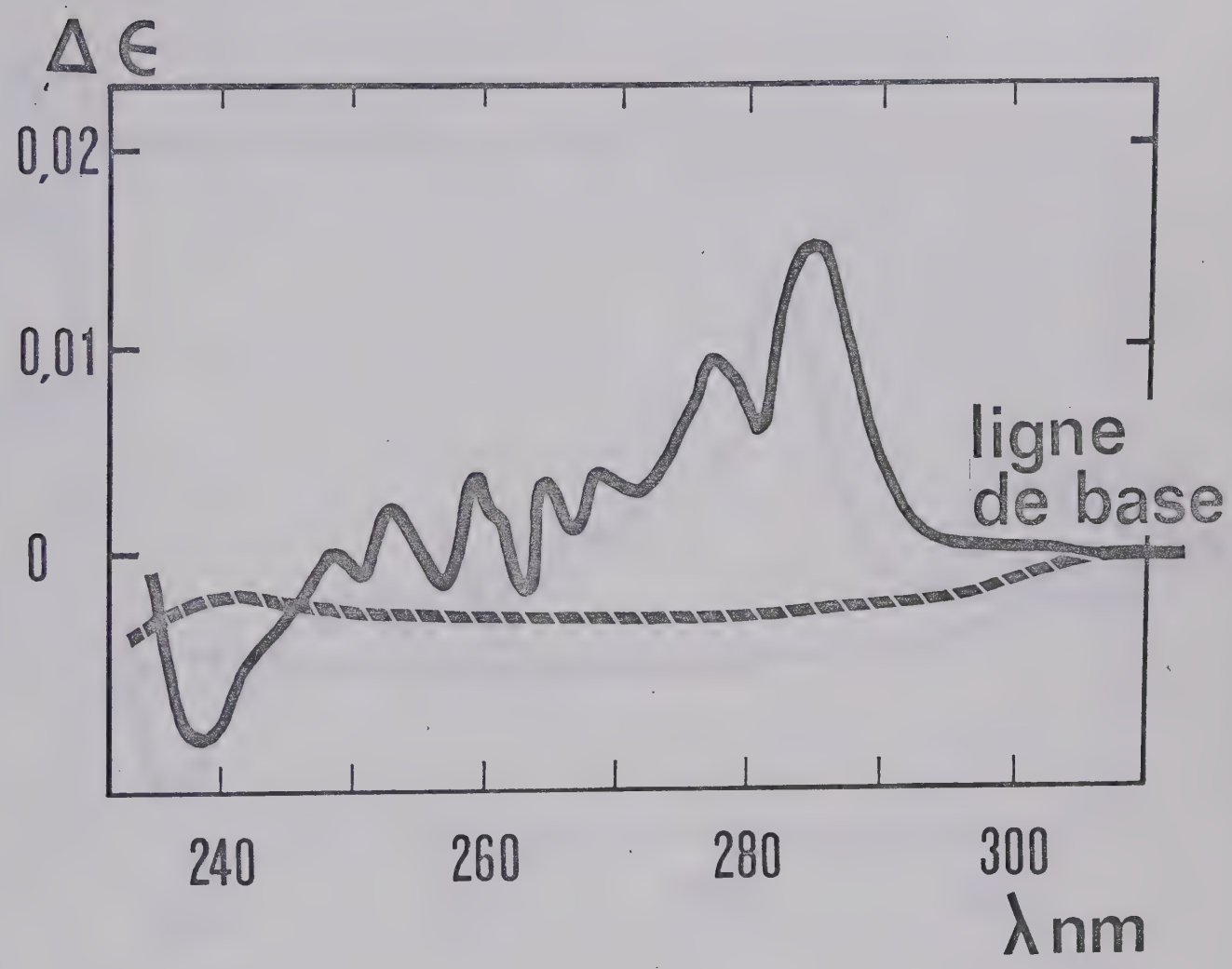


Figure 11 : Spectre de perturbation de l'isomérase native, en 20 % d'éthylène glycol.

- Concentration de l'isomérase $4{,}50 \times 10^{-5}$ M.
Activité spécifique 64.000 u/mg.
- Température 19 $\pm$ 0,5° C.

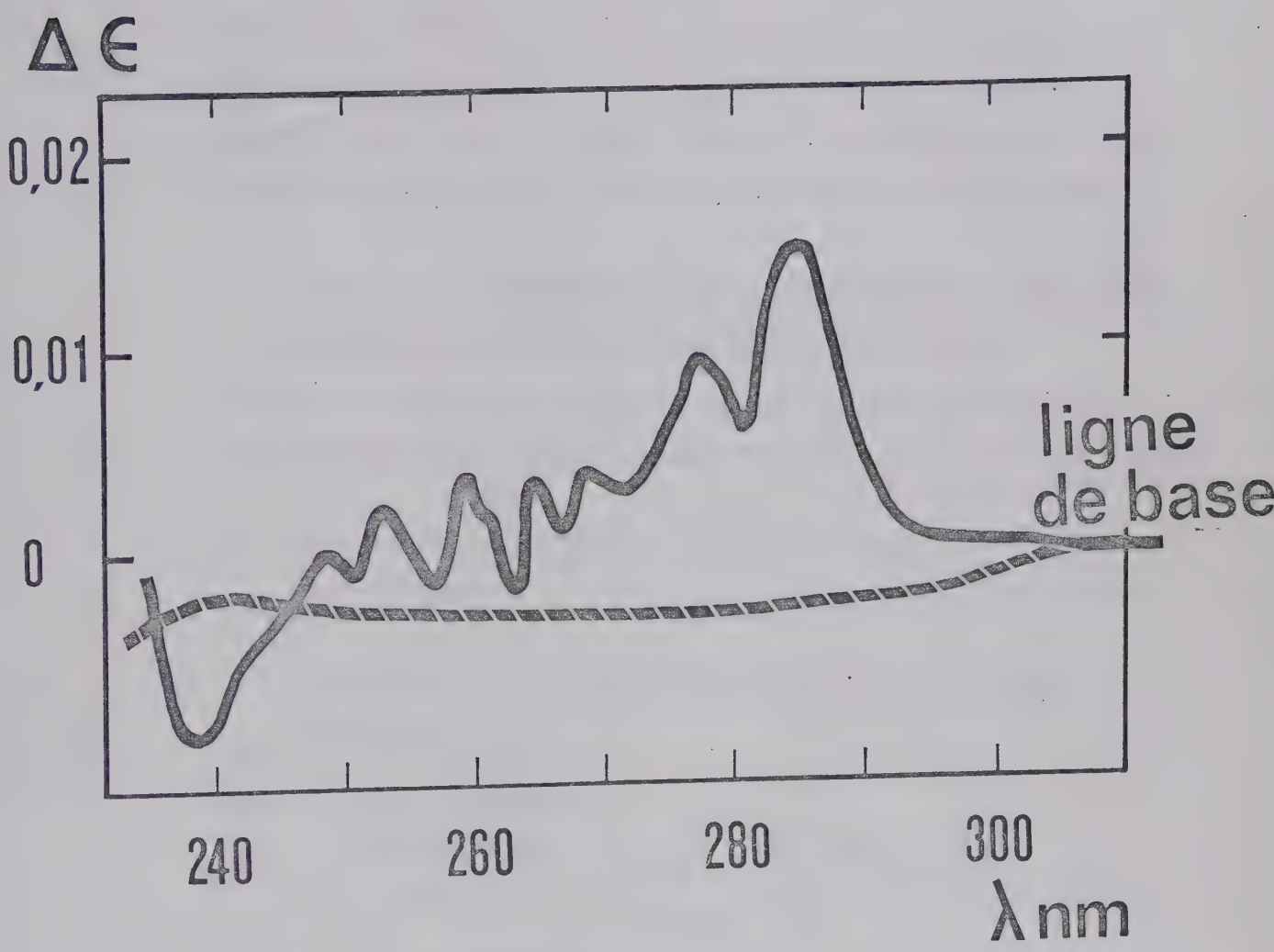


Figure 12 : Spectre de perturbation du composé modèle, en 20 % d'éthylène glycol.

- Tyrosines 4,05 x 10^{-4} M
- Phénylalanines 1,05 x 10^{-3} M
- Température 19 $\pm$ 0,5° C.

sont caractéristiques des perturbations des tyrosines, et 5 pics entre 270 et 235 nm caractéristiques des perturbations des phénylalanines. Les absorbances de ces pics sont 0,0075, 0,0065, 0,007, 0,005 et 0,003.

Calcul du pourcentage des chromophores, tyrosines et phénylalanines accessibles au solvant.

Spectres directs du composé modèle et de la protéine par rapport à un blanc, constitué par du tampon phosphate

- Composé modèle $D.O._{274\ nm} = 0,55$
- Isomérase $D.O._{277\ nm} = 0,759$

Calcul à 287 nm du pourcentage des tyrosines exposées (F_{tyr}).

Spectres de différence

- Composé modèle $\Delta E_{284\ nm} = 0,0180$
- Isomérase ΔE $\Delta E_{287\ nm} = 0,011$

d'où

$$F_{tyr} = \frac{0,011 \times 0,55}{0,759 \times 0,018} = 44,5\ \%$$

Calcul à 260 nm du pourcentage des phénylalanines exposées ($F_{Ph.ala}$).

- Composé modèle $\Delta E_{260\ nm} = 0,007$
- Isomérase $\Delta E_{260\ nm} = 0,004$

$$F_{Ph.ala} = \frac{0,004 \times 0,55}{0,007 \times 0,759} = 41,5\ \%$$

Après dialyse de l'isomérase en éthylène glycol 20 % contre du tampon phosphate 0,03 M, on retrouve l'activité et le spectre d'absorption de l'isomérase en tampon phosphate.

Les pics de différence (caractéristiques des tyrosines) par solvants perturbants ne sont pas déplacés ce qui semblerait être en faveur d'un effet perturbant et non dénaturant par l'éthylène glycol.

D'après les résultats on voit que 44,5 % des 9 tyrosines présentes dans l'isomérase sont plus ou moins accessibles au solvant, et que les 63,5 tyrosines restantes sont partiellement masquées et inaccessibles. Pour chacune des 9 tyrosines nous admettrons donc des états intermédiaires.

Par des études de diffraction aux rayons X, faites sur un très grand nombre de protéines, on peut affirmer aujourd'hui, qu'à quelques exceptions près, tous les groupes ioniques des résidus de chaînes latérales sont complètement exposés au solvant (27). Par contre, tous les groupes apolaires ne sont pas forcément complètement masqués au solvant. Ceci est également vrai pour les chromophores apolaires tyrosines et phénylalanines. Browne et call. (28) distinguent 3 catégories de groupes dans le lysozyme. Le premier étant constitué par des résidus complètement projetés vers le solvant, et en contact avec celui-ci ; le deuxième groupe serait celui

dans lequel quelques atomes du résidu amino-acide seraient en contact avec le solvant, et un troisième type dans lequel des résidus seraient complètement inaccessibles au solvant.

En présence d'éthylène-glycol, qui est une petite molécule, nous ne pouvons distinguer entre le groupe 1 et 2, car ce perturbant peut pénétrer dans des crevasses de la molécule et venir en contact avec les chromophores tyrosines et phénylalanines.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Talalay (7), qui titre 4 tyrosines avec un pK voisin de 9,8 et les 5 autres avec un pK supérieur à 11. Les quatre tyrosines accessibles à l'éthylène glycol pourraient donc correspondre à ces quatre tyrosines de pK normal.

CHAPITRE II

SPECTROFLUORIMETRIE

ETUDE DES CHROMOPHORES INTRINSEQUES DE L'ISOMERASE.

1 - Généralités

Lorsqu'une molécule M à l'état fondamental F absorbe un photon de lumière d'énergie $h\nu$ (processus qui est très rapide et dure environ 10^{-15} sec), un de ses électrons passe à un niveau énergétique plus élevé A^*. La molécule est dans un état excité M^*. A l'absorption des quantums correspondent des transitions électroniques produisant l'apparition d'un spectre des bandes d'absorption, dans lequel interviennent toutes les transitions électroniques, vibrationnelles et rotationnelles. Si de ce fait la molécule ne se décompose pas (grand accroissement d'énergie potentielle) et si toute l'énergie n'est pas dissipée par les collisions avec d'autres molécules, l'électron retourne au bout de 10^{-8} à 10^{-7} sec. à un niveau énergétique plus bas et réémet un

photon $h\nu_1$ au cours de ce processus. La différence entre l'état fondamental F et un état intermédiaire excité détermine l'énergie de la radiation émise. Quand l'état est singulet (S^*) on appelle cette radiation, fluorescence. Les niveaux énergétiques A^* et S^* ont leur spins inchangés par rapport à l'état fondamental (état singulet). La fluorescence émet une énergie plus faible que l'énergie absorbée, et la longueur d'onde de l'émission de fluorescence est plus grande que celle de la radiation excitatrice (loi de Stokes).

La plupart des molécules qui absorbent une radiation d'énergie $h\nu$(29) ont deux types d'états excités, S^* déjà défini précédemment, et un état triplet T^* métastable (spin de même signe). La transition de l'état triplet T^*(de niveau énergétique plus faible que l'état S^*), à l'état fondamental F, produit le phénomène de phosphorescence. Une transition $F \rightarrow T^*$ est une transition peu probable, mais les molécules excitées à l'état triplet peuvent revenir vers F en passant par S^*; elles doivent donc recevoir de l'énergie de leur milieu environnant, par élévation de la température par exemple. La longueur d'onde λ d'émission de phosphorescence est plus grande que la longueur d'onde de la fluorescence. Les molécules excitées n'ont pas les mêmes propriétés électriques, elles peuvent acquérir un moment dipolaire

de transition M_T (les charges électriques sont séparées). La loi des possibilités de transition postule que les transitions électroniques dans une molécule ne produisant pas de M_T appréciables, sont peu probables. L'effet de l'absorption d'une radiation avec une molécule diatomique est représentée sur la figure 1.

La durée de vie de l'état excité est caractérisée par un facteur τ tel que $I = I_o e^{-t/\tau}$.

I_o est le maximum de l'intensité de fluorescence pendant l'excitation.

I est l'intensité de fluorescence au temps t,

t est le temps qui s'est écoulé après suppression de la source d'excitation,

τ est la durée de vie de l'état excité. Tout phénomène qui tend à diminuer la durée de vie de l'état excité provoque une extinction de la lumière de fluorescence ou "quenching".

Le rendement quantique Φ de fluorescence est égal au pourcentage de l'énergie absorbée qui est réémise sous forme de fluorescence (30). $\Phi = 1$ en l'absence de toute autre voie de retour à l'état fondamental.

Pour qu'une molécule fluoresce, il faut qu'elle absorbe ; les maxima d'absorption correspondant en général au maxima des spectres d'excitation à $\pm$ 8 nm.

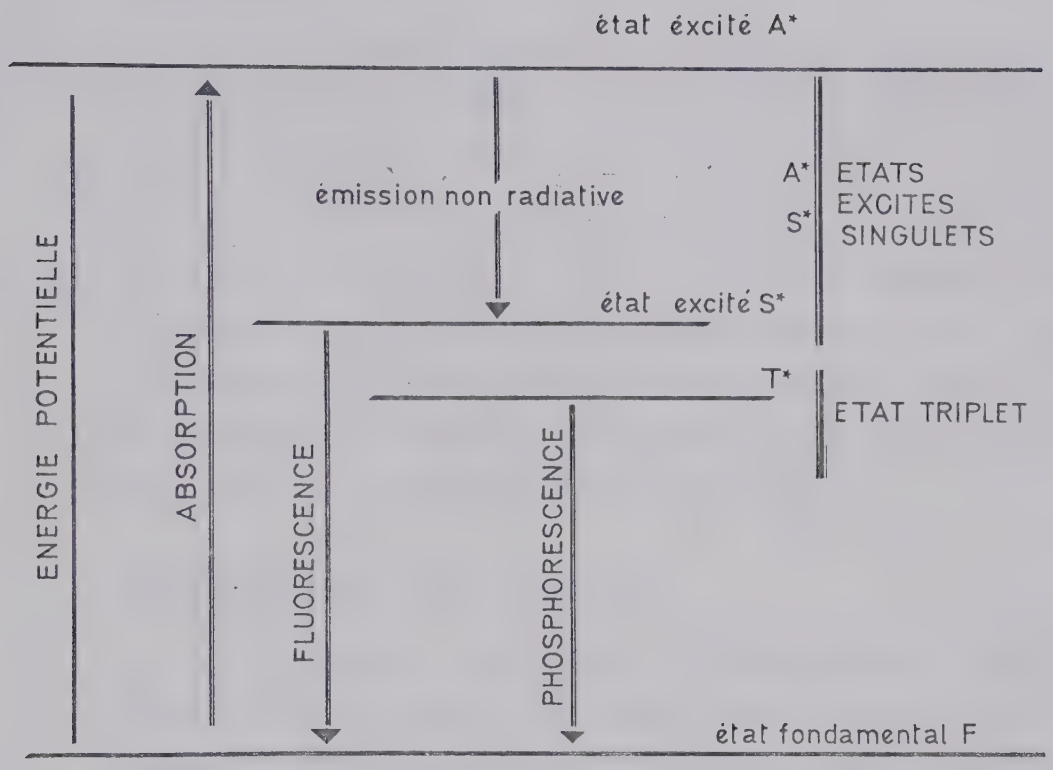


Figure 13 : Interaction d'une radiation avec une molécule diatomique.

Effet Rayleigh

Il se produit quand une radiation lumineuse de fréquence ν est réémise dans toutes les directions. Sans absorption d'énergie elle ne peut donc pas produire des transitions électroniques. L'énergie est complètement conservée.Un photon de même énergie $h\nu$ est réémis en 10^{-15} sec., et l'électron revient à son état fondamental F. La lumière émise a donc la même longueur d'onde que la lumière excitatrice. La lumière émise est appelée la diffusion de Rayleigh.

Fluorescence d'une protéine

Le spectre d'émission de fluorescence d'une protéine dans la région U.V. du spectre est dû aux 3 acides aminés fluorophores qu'elle contient : tryptophane, tyrosines et phénylalanines. Ces 3 acides aminés ont des spectres d'excitation et d'émission caractéristiques. Leur rendement quantique intrinsèque est différent (31).

La contribution globale à la fluorescence n'est pas égale à la somme des contributions des acides aminés chromophores qui la constituent. Dans une protéine native qui contient du tryptophane, la contribution au spectre d'émission de la tyrosine et de la phénylalanine est négligeable car le tryptophane masque leur présence (32). En plus, d'après Konev (32) la fluorescence élevée du tryptophane dans une protéine native pourrait être due à un

transfert d'énergie entre la tyrosine et le tryptophane.

Comme en absorption, le quantum d'énergie d'émission à partir de l'état excité dépend de l'environnement des groupes fluorophores.

D'après Teale et Weber (31)

Rendement quantique de ces 3 acides aminés libres :

	Ph. ala	Tyr.	Trypt.
a - Milieu acide	$\simeq 0$	0,056	0,085
b - Milieu neutre	0,04	0,21	0,20
c - Milieu basique		$\simeq 0$	0,051

Bien que la tyrosine et le tryptophane aient des rendements quantiques identiques dans l'eau, le tryptophane contribue plus à la fluorescence que la tyrosine à cause de son absorbance plus élevée.

Pour la même raison, la contribution de la phénylalanine est très faible, car son absorbance moléculaire est faible. Pour les solutions diluées on a en effet (29) :

$$F = I_o \times 2,3 \times E_M \times c \times d \times \phi$$

F = fluorescence totale (en quanta par sec.)

I_o = intensité de la lumière excitatrice (en quanta par sec.)

c = concentration de la solution

d = trajet optique de la solution

E_M = absorbance moléculaire

ϕ = rendement de fluorescence.

2 - Données spectrofluorométriques de l'isomérase.

L'isomérase appartient à la classe des protéines qui ne contiennent pas de tryptophane et la fluorescence observée est entièrement due aux tyrosines présentes dans la molécule (31,32).

Les caractéristiques spectrofluorométriques de l'isomérase ont été étudiées en solution tampon phosphate de potassium 0,03 M, pH 7,0, KCl 0,1 M à 25° C, à l'aide d'un spectrofluorimètre Aminco Bowman. Les largeurs de 3 fentes utilisées sont : pour la lumière excitatrice, en partant du monochromateur jusqu'à la cuve : 3 mm, 3 mm et 2 mm. Pour la lumière d'émission, en partant de la cuve jusqu'au monochromateur d'analyse: 2 mm, 3 mm, et 3 mm. Précision des mesures $\pm$ 10 nm. Les intensités de fluorescence sont données en unités arbitraires (I_f).

a) Spectre d'excitation de fluorescence

En fixant le monochromateur d'analyse de fluorescence à 315 nm, on observe 2 maxima d'excitation. Le premier qui est plus intense se situe vers 280 nm, et le second qui est peu intense se trouve vers 230 nm (fig.14),

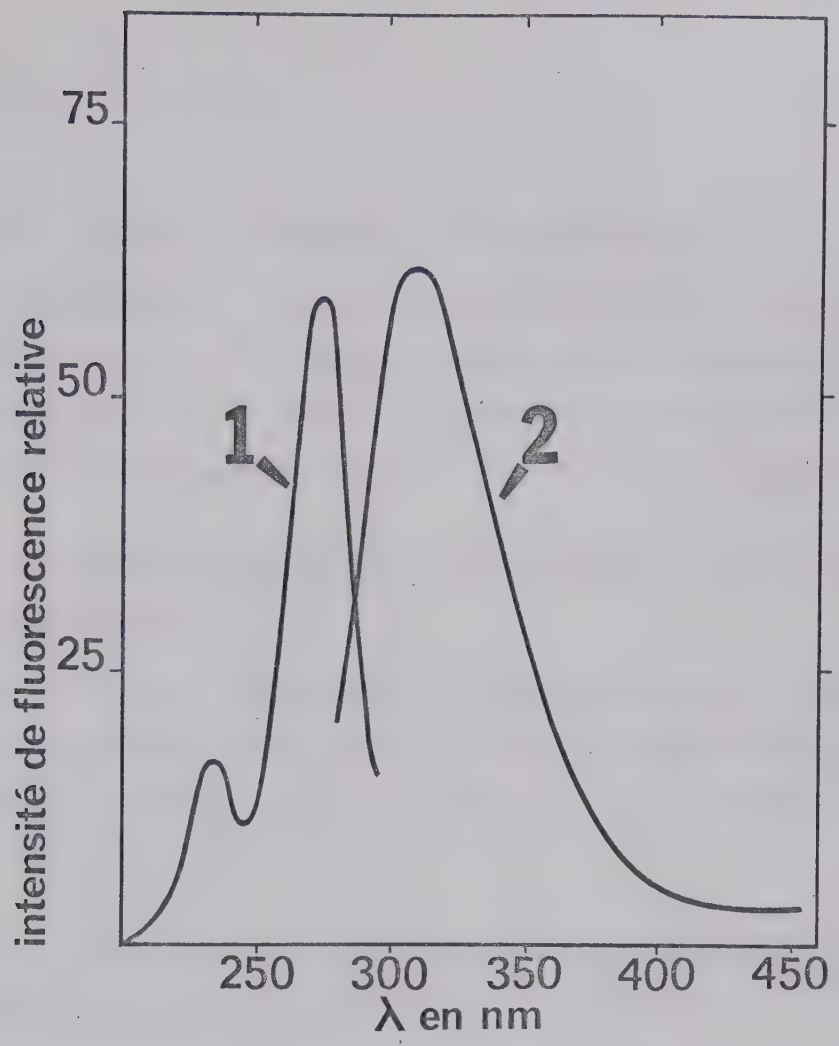


Figure 14 : Spectre d'excitation (1) et d'émission de fluorescence (2) de l'isomérase ($7,3 \times 10^{-6}$ M) en solution tampon phosphate de potassium 0,03 M, pH 7,0, KCl 0,1 M. Température 22° C.
Pic d'excitation 280 nm, pic d'émission 315 nm.

b) Spectre d'émission de fluorescence

En excitant la solution d'isomérase à 280 nm (correspondant à la région d'absorption maximum des tyrosines à $\pm$ 3 nm près), on observe un spectre d'émission de fluorescence avec un pic à 315 nm (figure 14).

c) Relation entre la concentration et l'intensité de fluorescence

Nous avons déterminé la proportionnalité entre la concentration en isomérase et son intensité de fluorescence relative. Cette linéarité est observée entre 0,59 et 3,58 10^{-6} M.

d) Fluorescence comparée de la protéine et du composé modèle à la même concentration molaire

Nous avons comparé l'intensité de fluorescence et les maxima des spectres d'excitation et d'émission d'un mélange modèle correspondant à 9 tyrosines et 24 phénylalanines avec le spectre de la protéine de même concentration molaire et dans les mêmes conditions de milieu solvant.

La figure 15 montre que l'intensité de fluorescence de l'isomérase correspond à 57 % de l'intensité de fluo-

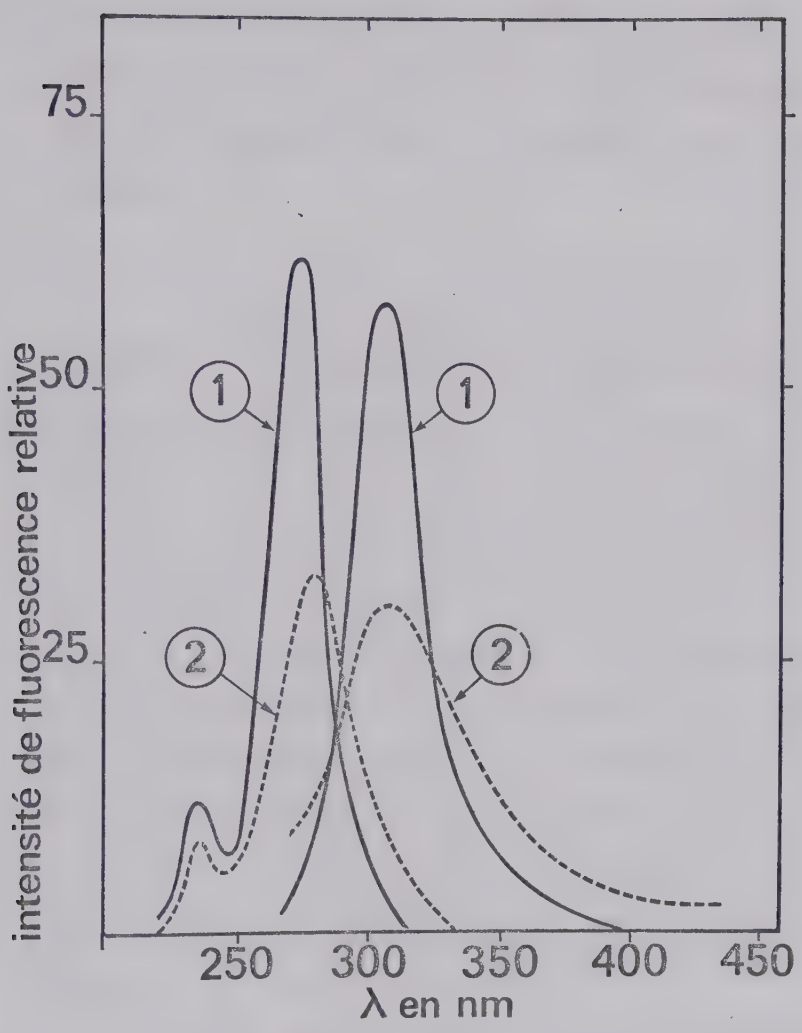


Figure 15 : Spectre d'excitation et d'émission de fluorescence du composé modèle et de l'isomérase en solution tampon phosphate de potassium 0,03 M, pH 7,0, KCl 0,1 M. Température 22°C.

1 Mélange modèle : Tyrosines : $1{,}62 \times 10^{-5}$ M
Phénylalanines : $4{,}3 \times 10^{-5}$ M

Pic d'excitation 275 nm, pic d'émission 303 nm.

2 Isomérase : $1{,}8 \times 10^{-6}$ M

Pic d'excitation 280 nm, pic d'émission 315 nm.

rescence du mélange modèle. Pour la protéine on observe un effet bathochrome par rapport au mélange modèle. Le pic d'excitation est à 274 nm, le pic d'émission à 303 nm, ce qui correspond à un environnement différent des chromophores de la protéine par rapport au composé modèle.

e) Influence de la polarité du milieu sur la fluorescence de l'isomérase et du mélange modèle.

Conditions d'expérience : la concentration en isomérase était de 1×10^{-5} M, la concentration en tyrosines de 9×10^{-5} M, et celle des phénylalanines de $2,4 \times 10^{-4}$M, la température de 22° C.

En présence de méthanol en concentrations croissantes, l'intensité de fluorescence du composé modèle et de l'isomérase croît, on remarque que la longueur d'onde des pics d'émission et d'excitation ne change pas. I_f passe de 42 en 0 % v/v de méthanol à 74 en 50 % v/v de méthanol. Pour l'isomérase entre 0 et 50 % v/v de méthénol, I_f passe de 47 à 67.

On peut donc conclure que l'isomérase et son mélange modèle se comportent de la même manière quand on passe d'un milieu plus polaire vers un milieu plus hydrophobe. Dans les protéines telles que la ribonucléase, l'insuline, l'ovomucoïde et la zéine qui ne contiennent pas de tryptophane(32) la position du pic

d'émission n'est pas affectée par des changements de conformation de la protéine. Nous avons observé avec l'isomérase en présence d'urée 8 M, un déplacement bathochrome.

3 - Fluorescence de l'isomérase en fonction du pH.

L'influence du pH sur la fluorescence de l'isomérase a été étudiée entre pH 2,78 et 11,5.

La concentration de l'enzyme est déterminée par son absorbance à 280 nm (E_M = 16.800).

Dans la cuve de mesure contenant 2,5 ml d'une solution d'isomérase à pH 7,0 en tampon phosphate 0,03 M, KCl 0,1 M, on ajoute à l'aide d'une microseringue Agla des volumes croissants de KOH 0,5 N , pour l'alcalinisation, ou de HCl 0,5 M pour l'acidification. Le mélange se fait par agitation magnétique. Les pH sont mesurés avant et après chaque enregistrement, dans les cuves de mesure à l'aide d'une microélectrode Inngold type 405 MS sur un pH mètre Radiometer "25" donnant des pH à $\pm$ 0,02 près. La figure 16 montre des spectres d'émission de fluorescence à différents pH.

La longueur d'onde des pics d'excitation ne change pas en fonction du pH. Pour les spectres d'émission un léger effet hypsochrome est observé aux pH extrêmes.

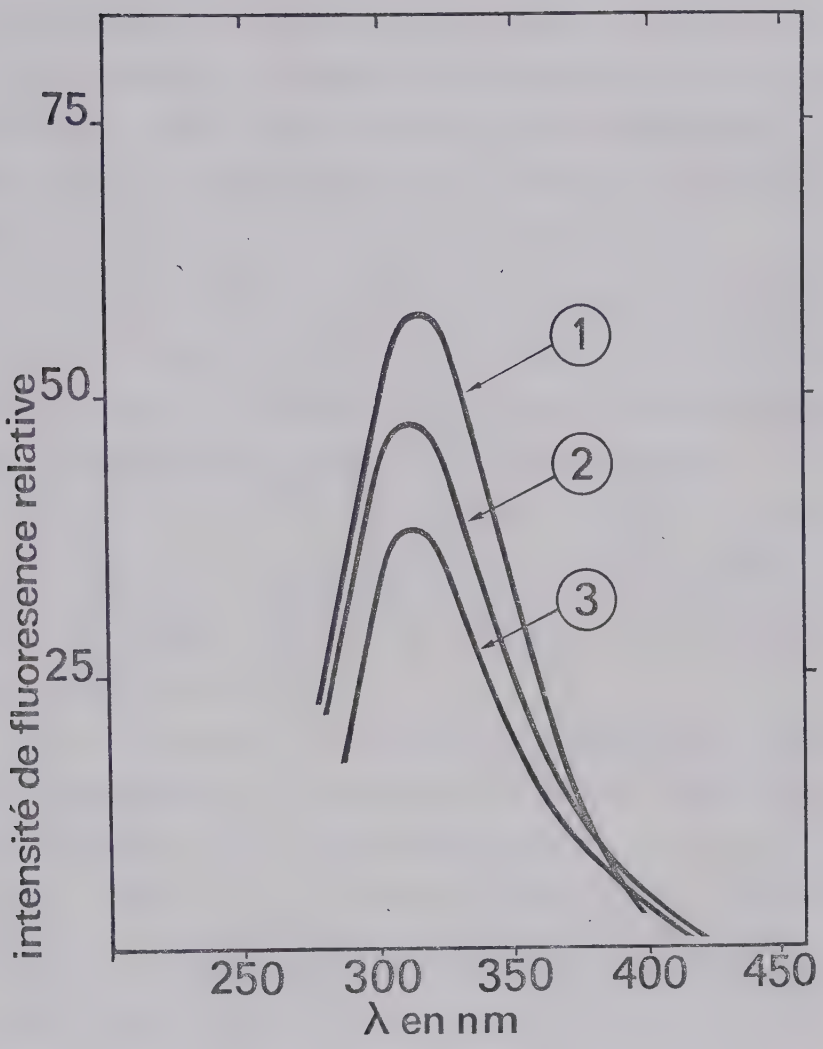


Figure 16 : Spectres d'émission de fluorescence de l'isomérase en fonction du pH.
L'isomérase est à la concentration $1,8 \times 10^{-6}$ M
Enregistrement (1) à pH 7,33
Enregistrement (2) à pH 10,75
Enregistrement (3) à pH 2,78

L'intensité de fluorescence change en fonction du pH.

La figure 17 montre la variation de I_f en fonction du pH pour une concentration en isomérase de 1,8 10^{-6} M (zone où la linéarité entre la concentration et l'intensité de fluorescence est observée).

Entre pH 2,78 et 3,8-3,9 l'intensité de fluorescence I_f reste constante (dans cette zone de pH la courbe de fluorescence en fonction du pH n'est pas réversible, comme d'ailleurs l'activité enzymatique).

De pH 4,13 à 5 l'intensité de fluorescence I_f décroît de 20 % environ. Puis de pH 5 à 6 elle croît, puis elle reste inchangée jusqu'à pH 8,3, et elle décroît de nouveau jusqu'à pH 11,5.

Dans la zone de titrage fluorimétrique où la courbe de fluorescence en fonction du pH est réversible, 3 pK d'ionisation ont pu être déterminés : à pH 4,3 (pK_1), à pH 5,7 (pK_2) et un vers pH 10,8 (pK_3). Etant donné l'étalement de la courbe de l'intensité de fluorescence en fonction du pH dans les zones où ces pK sont déterminés, ces résultats sont assez approximatifs.

Le premier pK_1 de 4,3 pourrait être attribué à l'ionisation d'au moins un carboxyle, et ce COO^- pourrait contracter une liaison hydrogène avec le OH de la tyrosine, entraînant une ionisation partielle du phénol ($O^- \overset{\frown}{H^+}$), il en résulterait une diminution de la fluorescence. Le pK_2 de 5,7 pourrait correspondre à l'ionisation d'un carboxyle anormalement élevé. Cette ionisation peut induire un changement de l'environnement des

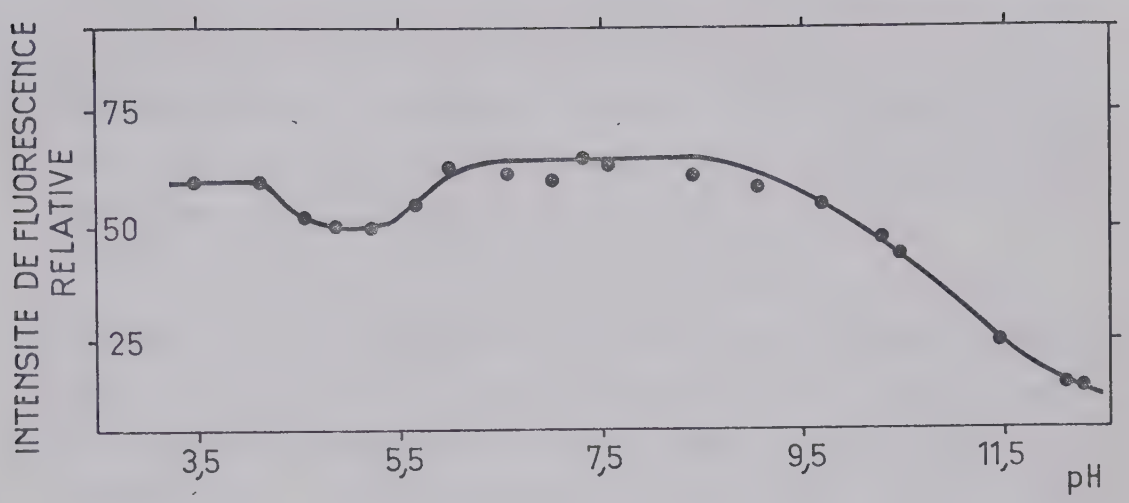


Figure 17 : Variation de l'intensité de fluorescence de l'isomérase en fonction du pH.
L'isomérase est à la concentration : $1,80 \times 10^{-6}$ M.
Le maximum d'excitation est à 280 nm et le maximum d'émission à 315 nm.

tyrosines, avec ou sans changement de conformation se traduisant par une modification de la fluorescence des tyrosines. Dans le cas présent une augmentation de la fluorescence est observée (il ne s'agit pas de la rupture des liaisons hydrogène car il en résulterait une diminution de l'intensité de fluorescence I_f).

Le pK_3 de 10,5 - 10,7 que l'on observe pourrait correspondre à l'ionisation d'une tyrosine et l'extinction observée serait due au transfert d'énergie vers les tyrosines ionisées (34). En effet, comme nous l'avons vu (page 44), d'après Teale et Weber (31), les tyrosines en milieux basiques, donc ionisées, ont un rendement quantique pratiquement nul. Cependant une extinction par les amines (NH_2) ne peut être complètement éliminée (35). Il est probable que les tyrosines qui fluorescent ne sont pas impliquées dans des liaisons hydrogène. En effet, d'après Konev (32), une liaison hydrogène avec le OH de la tyrosine entraîne une ionisation partielle du phénol et on est ramené au cas précédent.

Remarque : Nous verrons plus loin (fig. 28, page 94) qu'à pH 9,5, l'enzyme s'inactive irréversiblement après 10 minutes d'incubation. Cependant dans les conditions des mesures des activités l'enzyme est 10^6 fois plus dilué que dans les expériences de fluorescence et il s'inactive plus facilement par l'effet de la dilution.

CHAPITRE III

ETUDE DE L'ISOMERASE PAR DICHROISME CIRCULAIRE

a - Généralités

L'interaction entre la lumière monochromatique polarisée circulairement et des molécules optiquement actives se caractérise par quatre indices :

- Les deux indices de réfraction n_G et n_D ;
- Les deux indices d'absorption ε_G et ε_D.

La différence $\Delta\varepsilon = \varepsilon_G - \varepsilon_D$ définit le dichroïsme ; il se caractérise par la différence d'absorption par les chromophores optiquement actifs des composantes droite et gauche de la lumière polarisée. Le dichroïsme circulaire mesure l'altération de la lumière polarisée après passage au travers de la solution optiquement active. Il s'exprime pour les polypeptides et les protéines en degrés x cm^2/decimole par résidu moyen . On définit ainsi une ellipticité moléculaire par résidu moyen " $(\theta)_m$ "

$$(\theta)_m = \frac{\theta^\circ \times M_n}{10 \times l \times c}$$

θ° est l'ellipticité en degrés que l'on mesure sur le

dichrographe, à une longueur d'onde donnée λ en nm.
M_n est la masse moléculaire moyenne en poids par résidu du soluté optiquement actif. Pour l'isomérase, M_n est égale à 40800/375 soit 109.
l est le trajet optique dans la cuve de mesure en cm.
c est la concentration en grammes par ml.

Dans la zone de longueurs d'onde de 185 à 250 nm, le dichroïsme circulaire reflète en particulier la contribution des motifs peptidiques de la protéine (transition $n \longrightarrow \pi^*$ des groupements amides ; dans la zone de 250 à 320 nm, ce sont des transitions $\pi \longrightarrow \pi^*$ de groupement aromatique qui sont responsables du dichroïsme observé.

L'étude du dichroïsme circulaire apporte des informations sur les conformations secondaire et tertiaire (36).

Des changements de structure peuvent être décelés par des altérations des caractéristiques dichroïques. Cette méthode donne une meilleure résolution par rapport à la dispersion rotatoire car elle permet d'obtenir des bandes dichroïques positives et négatives très étroites.

Des polypeptides de synthèse tels que la poly-L-lysine (37), et la poly-L-sérine (38) ont été utilisés comme modèles pour définir les caractéristiques dichroïques des différentes conformations : structure hélice-α, structure β (en feuillets plissés) et pelotes désordonnées.

b - Dichroïsme circulaire de l'isomérase.

Les spectres dichroïques de l'isomérase 8,95 x 10^{-6}M, en tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0 de 4 à 27° C ont été

enregistrés sur un dichrographe "Cary 61". Dans la région de l'ultra-violet lointain (182 - 250 nm), une cuve cylindrique en quartz de trajet optique de 0,5 mm a été utilisée; pour la zone du proche ultra-violet (250-310 nm), le chemin optique était de 20 mm. On travaille en présence d'azote.

La figure 18 montre la variation de $(\theta)_m$ entre 184 et 250 nm. Deux bandes dichroiques y sont observées : l'une avec un maximum positif à 193 - 194 nm, d'amplitude $+ 21.000 \pm 1.600$ degrés.cm^2/décimole, l'autre négative avec un maximum étalé sur 220-225 nm, de $(\theta)_m = -9.250$ degrés. cm^2/décimole. Un léger épaulement apparait vers 210 nm. Le spectre dichroique coupe la ligne de base à 184, 206,5 et 245 nm.

La figure 19 montre la variation de $(\theta)_m$ entre 250 et 310 nm (courbe a). Le dichroïsme qu'on y observe est dû aux transitions $\pi \longrightarrow \pi^*$ des phénylalanines et tyrosines. Plusieurs bandes dichroïques y sont observées, à 257 et 264 nm dues aux transitions des phénylalanines. Les bandes à 270, 271,5 et 284 nm sont attribuées aux transitions des tyrosines. L'amplitude de $(\theta)_m$ la plus élevée correspond à 73,5 degrés.cm^2/décimole à 277,5 nm. La figure 19 courbe b, montre également le spectre d'absorption d'une solution d'isomérase plus concentrée ($3,3.10^{-5}$ M) dans les mêmes conditions expérimentales.

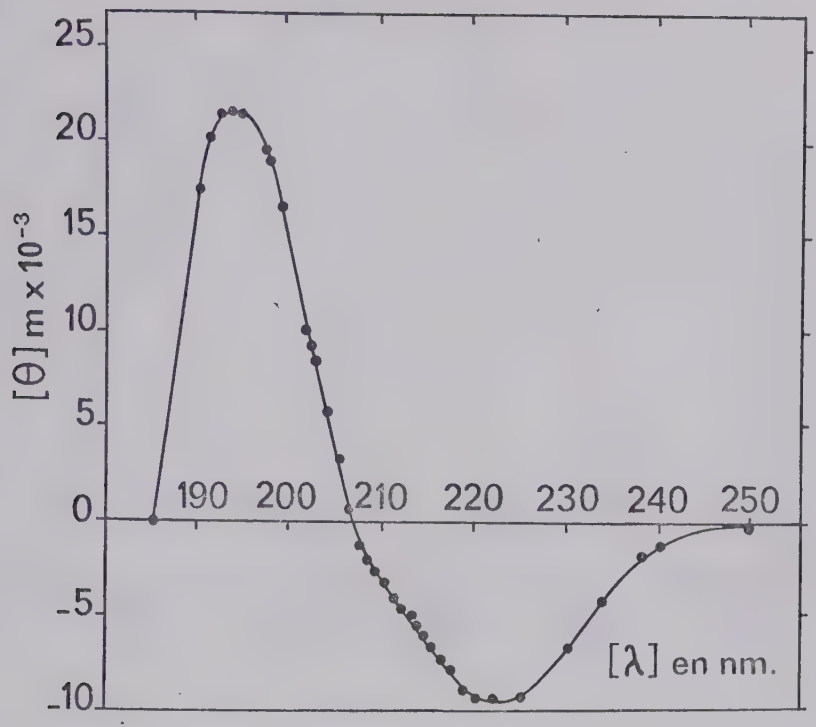


Figure 18

Spectre dichroïque (184 à 250 nm) de l'isomérase 8,95 x 10^{-6} M en tampon phosphate de potassium 0,03 M pH 7,0. Température 4 à 27° C, trajet optique de la cuve 0,5 nm.
L'ellipticité est exprimée en degrés.cm^2/décimole par résidu moyen (M_n = 109).

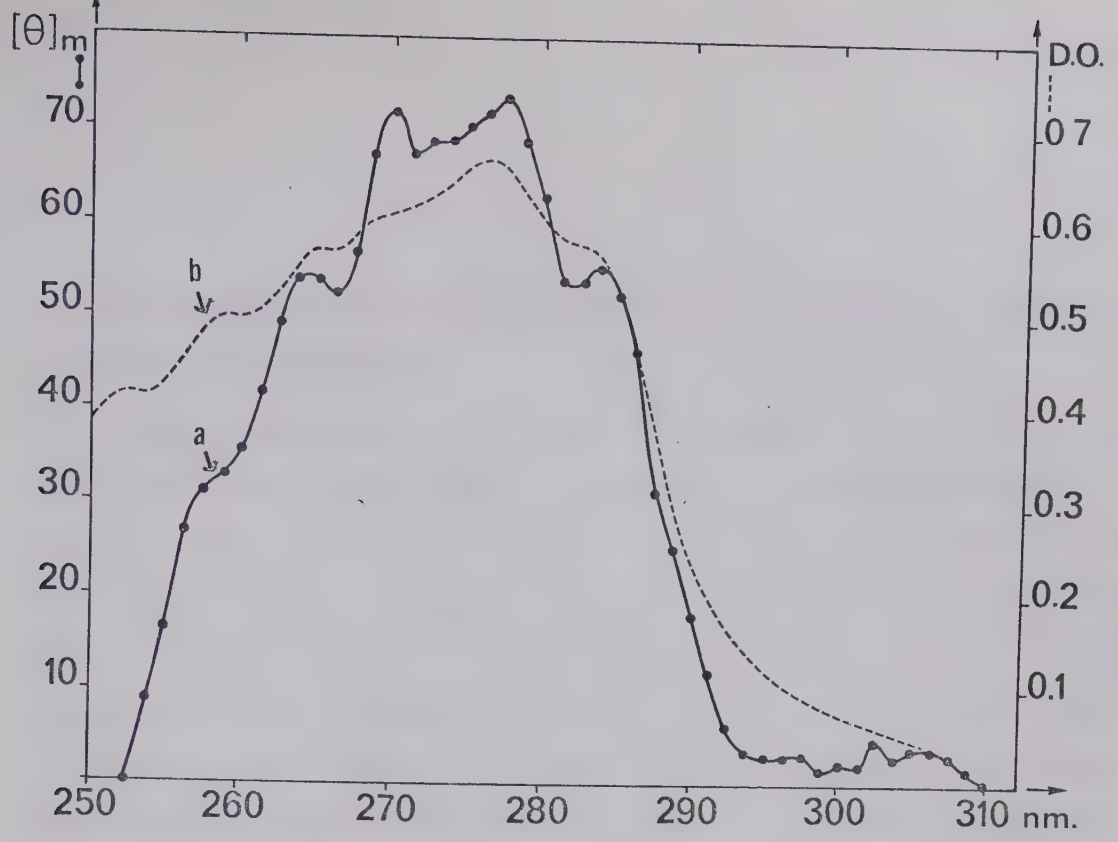


Figure 19

Courbe a - Spectre dichroïque (250-310 nm) de l'isomérase $8,95.10^{-6}$ M en tampon phosphate de potassium 0,03 M, pH 7,0, température 4 à 27° C. L'ellipticité s'exprime en degrés x cm^2/décimole par résidu moyen (M_n = 109). Trajet optique de la cuve : 20 nm.

Courbe b - Spectre d'absorption de l'isomérase (250-310 nm) $3,3.10^{-5}$ M, dans les mêmes conditions expérimentales.

c - Détermination du pourcentage de différentes conformations de l'isomérase.

En appliquant la méthode de Fasman (37) à 208 nm pour le calcul du pourcentage en hélice-α, nous avons obtenu une valeur négative. Ceci provient du faible $(\theta)_m$ de l'isomérase à 208 nm (- 2.000 degrés.cm^2/décimole). Il est probable que cette faible valeur de $(\theta)_m$ est la conséquence de la participation des phénylalanines au spectre dichroïque dans cette zone de longueurs d'onde. Cependant nous avons pu calculer le pourcentage en hélice-α à d'autres longueurs d'onde, entre 215 et 235 nm, en ajustant au mieux nos valeurs expérimentales de $(\theta)_m$ avec celles de courbes théoriques (37) obtenues à partir d'une combinaison linéaire de 3 conformations. Les meilleurs résultats d'après cette méthode de calcul, qui restent cependant très approximatifs, correspondent à : 75 ± 10 % de structure β, 10 ± 5 % d'hélice-α, et par différence on obtient le pourcentage en pelotes désordonnées.

Ce résultat n'est pas surprenant, puisque l'allure générale de la courbe dichroïque suggère un pourcentage très élevé en structure β et un contenu très faible en hélice-α et pelotes désordonnées (37,39).

Cependant, même pour la structure supposée 100 % β, les $(\theta)_m$ données par Fasman (37) sont trop élevées par rapport à l'isomérase. Li et Spector (39), montrent d'ailleurs que les $(\theta)_m$ données par Fasman sont surestimées.

En reprenant les mêmes expériences, Li et Spector montrent que la poly-L-lysine à pH 11,5 et chauffée à 50° C, est contaminée par 15 % d'hélice-α. En préparant un matériel pur, soit par élimination de ces 15 % d'hélice-α, par centrifugation (la forme hélicoïdale reste dans le surnageant), soit par solubilisation de la poly-L-lysine par le dodécyl sulfate de sodium à 1 %, Li et Spector obtiennent une valeur de $(\theta)_m$ vers 218 nm très voisine de celle de l'isomérase (tableau IV). D'après l'analyse des caractéristiques dichroiques de l'isomérase entre 182 et 250 nm, cette dernière semble contenir une forte proportion de structure β - 80 % environ. La bande positive à 193-194 nm est caractéristique de feuillets plissés antiparallèles, car les feuillets parallèles présenteraient une bande vers 181 - 184 nm. Le $(\theta)_m$ à 208 nm est faible et représente 20 % de l'amplitude de la bande dichroïque à 220-225 nm, or dans les polypeptides et protéines sous forme hélicoïdale ces deux amplitudes sont voisines (36,37). Ceci est un argument supplémentaire en faveur du fort pourcentage de la structure β. Cependant l'isomérase présente un léger déplacement bathochrome de la bande manimum par rapport à la poly-L-lysine sous forme β. Nos résultats sont, par contre, très voisins de ceux de la poly-L-sérine sous forme β (38), où le minimum dichroïque a lieu vers 220-223 nm avec un $(0)_m$ de - 9.000 degrés.cm^2/décimole.

Le choix d'un polypeptide de synthèse comme modèle pour l'étude de la conformation secondaire et tertiaire

TABLEAU IV

COMPARAISON DES PARAMETRES $(\theta)_m$[1] DE LA POLY-L-LYSINE (37) ET DE L'ISOMERASE.

Position des pics en nm	$(\theta)_m$ en degré x cm^2/décimole	Intersection avec la ligne de base en nm
1) Structure β (poly-L-lysine)		
195	27.900 ± 4.400	207
217	-19.000 ± 3.000	
218 (38)	- 9.000 ± 1.300	
2) Structure hélice-α (poly-L-lysine)		
190,5	+71.500 ± 6.300	200
207	-38.900 ± 3.900	
221	-39.800 ± 3.900	
222 (40)	-32.000	
3) Isomérase[2]		
193 - 194	+21.600 ± 1.650	206,5
208	- 2.160	
220-225	- 9.250	

[1] Les $(\theta)_m$ sont exprimés par résidu moyen en poids.

[2] Le poids moléculaire moyen par résidu est de 109 (40.800/375).

d'une protéine est donc très délicat. D'une part ces polypeptides sont constitués par un enchaînement du même résidu amino-acide, d'autre part le microenvironnement des résidus dans la protéine est moins homogène que dans le polypeptide. Ces résultats sont donc très approximatifs. Néanmoins, on peut conclure que l'isomérase est assez compacte à son pH d'activité optimum. Ceci confirme les résultats obtenus par la R.M.N. (p.60). L'enzyme semble d'ailleurs très stable entre 4 et 27° C, où une réversibilité parfaite de courbes dichroïques est observée. Dans la région du proche ultra-violet, les bandes dichroiques se superposent approximativement aux pics d'absorption des chromophores tyrosines et phénylalanines (tableau V).

Les courbes dichroïques ne nous permettent pas de conclure quelle est la participation des chromophores masqués et accessibles au solvant au dichroïsme observé dans le proche ultra-violet. Les bandes dichroïques sont étalées ce qui suppose un microenvironnement des chromophores non homogène et une structure compacte.

Dans un travail futur nous essayerons de modifier la nature du solvant pour différencier avec plus de précision entre la structure en hélice-α, la structure β et les pelotes désordonnées. En effet, dans les protéines à structure β, l'intensité des deux maxima (à 195 et 217 nm) est fonction de la polarité du milieu, alors que dans la structure hélice-α seule la bande à 208 nm est modifiée.

TABLEAU V

Comparaison des bandes dichroïques de l'isomérase aux pics d'absorption de l'isomérase et de son composé modèle[a] dans le proche ultra-violet.

Position des pics d'absorption λ en nm		Paramètres dichroïques de l'isomérase	
Composé modèle[a]	Isomérase	Posidion de bandes dichroïques. λ en nm	$(\theta)_m$ [b]
252,0	253,0		
258,0	259,0	258,0	31,5
264,0	265,0	264,0	54,5
268,0	269,0	269,0	72,0
275,5	277,0	277,5	73,5
281,5	283,0	284,0	55,5

(a) Le composé modèle est constitué d'un mélange d'amino-acides aromatiques, ayant la même composition (9 tyrosines et 24 phénylalanines) et la même concentration molaire que l'isomérase.

(b) L'ellipticité $(\theta)_m$ est exprimée en degrés x cm^2/décimole par résidu moyen de l'isomérase (Mn = 109).

CHAPITRE IV

RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DE L'ISOMERASE

La R.M.N. désigne le processus par lequel une particule élémentaire (le noyau) absorbe une radiation électromagnétique quand elle est placée dans un champ magnétique. Un certain nombre de noyaux possède un moment magnétique propre $\vec{\mu}$ ($\vec{\mu}$ s'exprime en magnéton nucléaire), on admet que le noyau possède un spin. La valeur du moment magnétique $\vec{\mu}$ est égale à $\gamma h\vec{I}$.

γ est appelé le rapport gyromagnétique de spin, sa valeur est caractéristique du noyau considéré.

$\vec{I}$ est la valeur maximum du moment angulaire de la particule élémentaire, h est la constante de Planck.

Lorsqu'on soumet les molécules protéiques en solution à un champ magnétique H_o, l'ensemble des particules nucléaires qui les constituent se met à tourner dans un mouvement de précession autour du champ appliqué "H_o" à une fréquence de résonance, dite de Larmor ω_o égale à γH_o, ω_o est caractéristique du noyau observé et s'exprime en cycles par seconde (c.p.s.). Pour observer ω_o, on utilise un champ de radiofréquence H_1 de fréquence ω. Si ω_o est différent de ω, la particule poursuit son mouvement de précession autour de H_o, sans perturbation et rien n'est observé.

Si ω_o est égal à ω, le mouvement de la particule (considéré comme un dipôle) est perturbé et une aimantation transversale apparaît.

Si on met une bobine réceptrice dans un plan perpendiculaire au champ H_o, on recueille un signal d'induction magnétique d'amplitude maximum quand $\omega = \omega_o$. La détermination de ces fréquences de résonance permet de tracer des spectres de R.M.N. (41,42).

Mesure de R.M.N. dans un champ magnétique stationnaire H_o

Dans les conditions de résonance on obtient un spectre en clochet défini par :

- La position des pics des clochets sur l'échelle des fréquences.
- La largeur en unités de fréquences.
- L'intensité ou amplitude, mesurée par la surface des clochets.

Chaque ensemble des noyaux de même type possédant le même environnement électronique donnera une ligne de fréquence ν_1. Dans le spectre R.M.N. il y aura autant de lignes que d'environnement différents pour un type de noyau. En présence des composés modèles constitués soit par des acides aminés, soit par des peptides, on a dressé un tableau en unités de fréquences de lignes de résonance magnétique (43). Ces fréquences de résonance s'expriment en $= \frac{\omega_o - \omega}{\omega_o} \times 10^6$, en parties par millions (p.p.m.).

La place des lignes est mesurée par rapport à une référence standard (constituée par le tétraméthylsilane). La distance qui sépare les lignes observées par rapport au standard est appelée déplacement. Le déplacement est un nombre.

On observe plusieurs types de déplacements selon qu'ils sont dûs à :

1 - L'interaction du noyau avec son environnement électronique, appelé déplacement diamagnétique.

2 - L'interaction directe entre noyaux (interaction spin-spin).

3 - L'interaction indirecte entre noyaux couplés par les électrons qui participent à des liaisons covalentes.

Ces trois types de déplacements sont dépendants aussi bien de l'environnement dans la molécule protéique que de l'environnement dû au solvant, ou à la fixation d'un ligand (oestradiol).

a - Isomérase à l'état natif :

L'isomérase lyophilisée est mise dans l'eau lourde (deux fois) pour deuterer tous les protons des chaînes latérales échangeables (sérine, thréonine, liaisons peptidiques, tryptophane, tyrosines, etc...). La figure (20) montre le spectre de R.M.N. à 220 MHZ de l'isomérase à l'état natif, concentration 10 mg/ml, pH voisin de 7. On y distingue des pics de résonance.Entre 0,5 et 3,5 p.p.m. on observe la

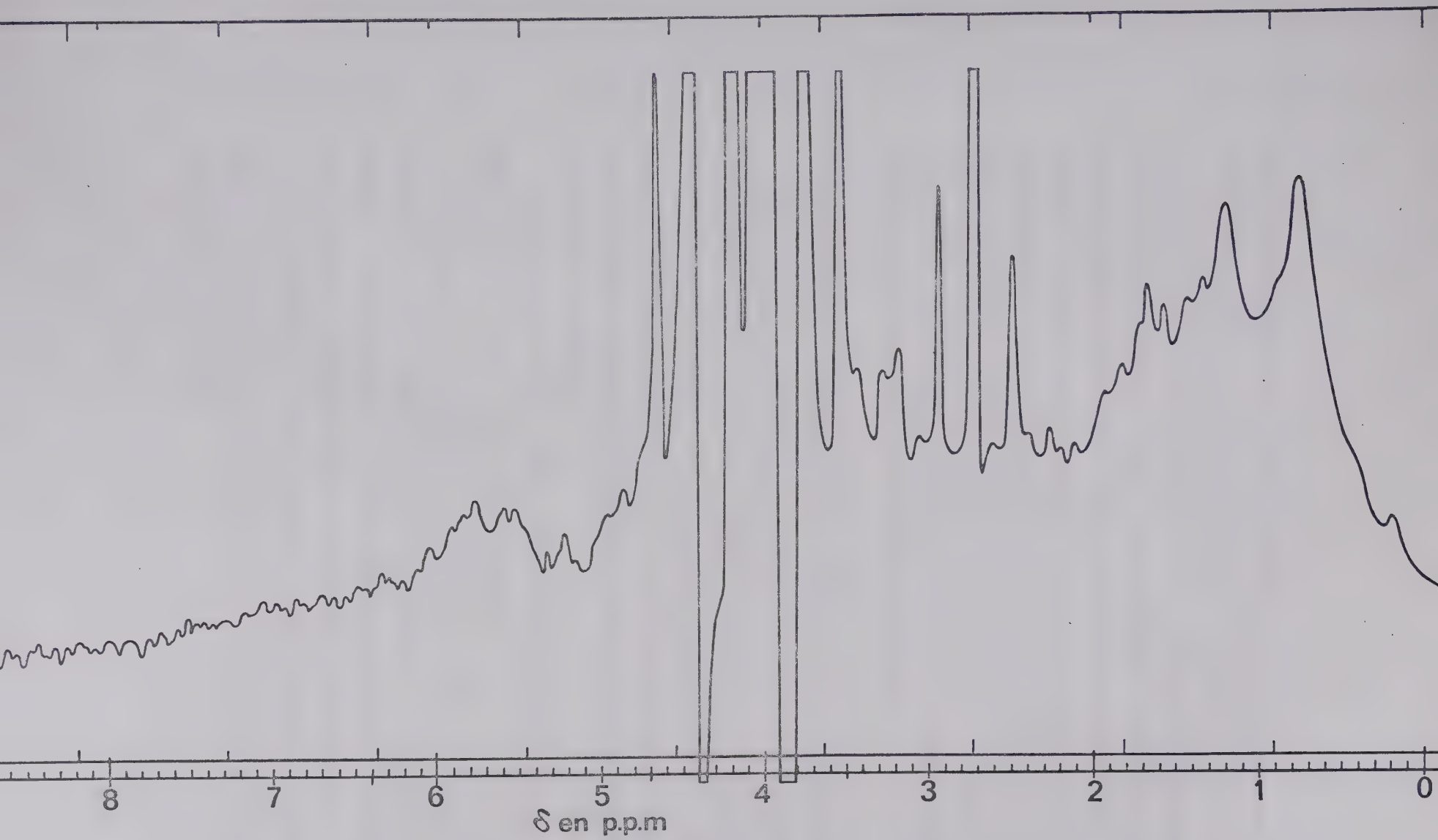


Figure 20 : Spectre de résonance magnétique nucléaire à 220 MHZ d'une solution d'isomérase 10 mg/ml à l'état natif dans l'eau lourde, pD 7,0.

résonance magnétique des protons liés aux groupes CH_3, CH_2 et CH des leucines, isoleucines et valines. Entre 4,7 et 6,3 p.p.m. les pics observés sont caractéristiques de la résonance de protons liés aux résidus tyrosines, phénylalanines et imidazoles. Le spectre de résonance de l'isomérase à l'état natif, montre l'existence d'une structure ordonnée compacte et repliée sur elle-même, car il est peu résolu et les protons liés aux différents groupes : CH_3, CH_2, CH, aromatiques et histidines, ne semblent pas avoir un environnement électronique homogène.

b - Isomérase dénaturée par l'acide trifluoroacétique (T.F.A.)

La figure 21 montre le spectre R.M.N. de l'isomérase dénaturée par le T.F.A.. Dans l'isomérase dénaturée les interactions liées à la structure secondaire et tertiaire sont en partie détruites et les protons appartenant à des résidus identiques sont placés dans un environnement électronique analogue.

Le spectre R.M.N. est plus résolu, la fréquence de chacune des bandes est mieux définie.

La figure 22 montre le spectre R.M.N. de la protéine calculé selon la méthode de Mc Donnald (43), qui tient compte à la fois de la constitution en amino-acides, et des signaux obtenus sur la protéine dénaturée par le T.F.A.

L'isomérase à l'état natif a donc ses différents pics déplacés vers de plus basses fréquences par rapport à la protéine dénaturée.

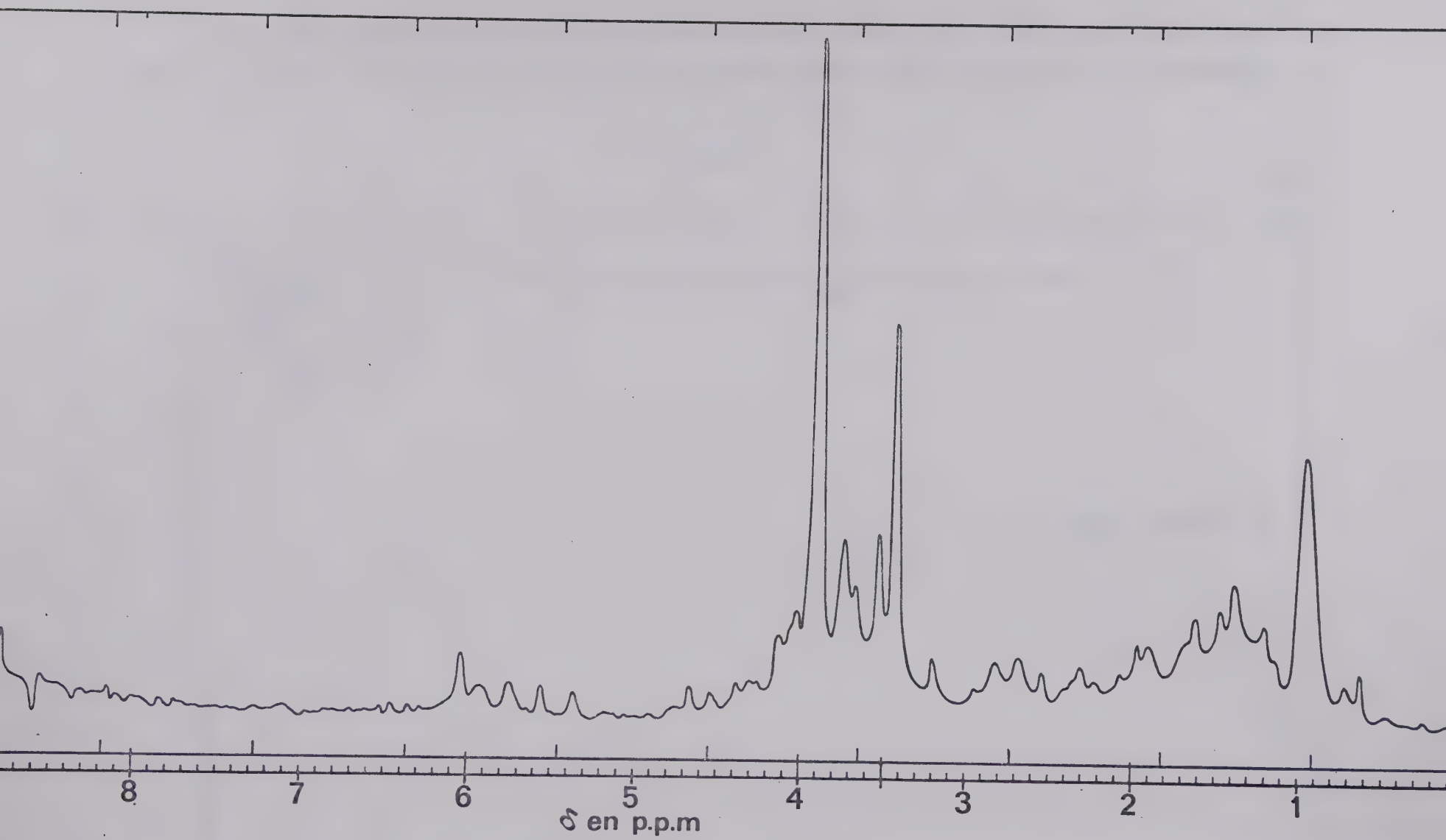


Figure 21 : Spectre de résonance magnétique nucléaire à 220 MHZ d'une solution d'isomérase 10 mg/ml dénaturée par l'acide trifluoroacétique.

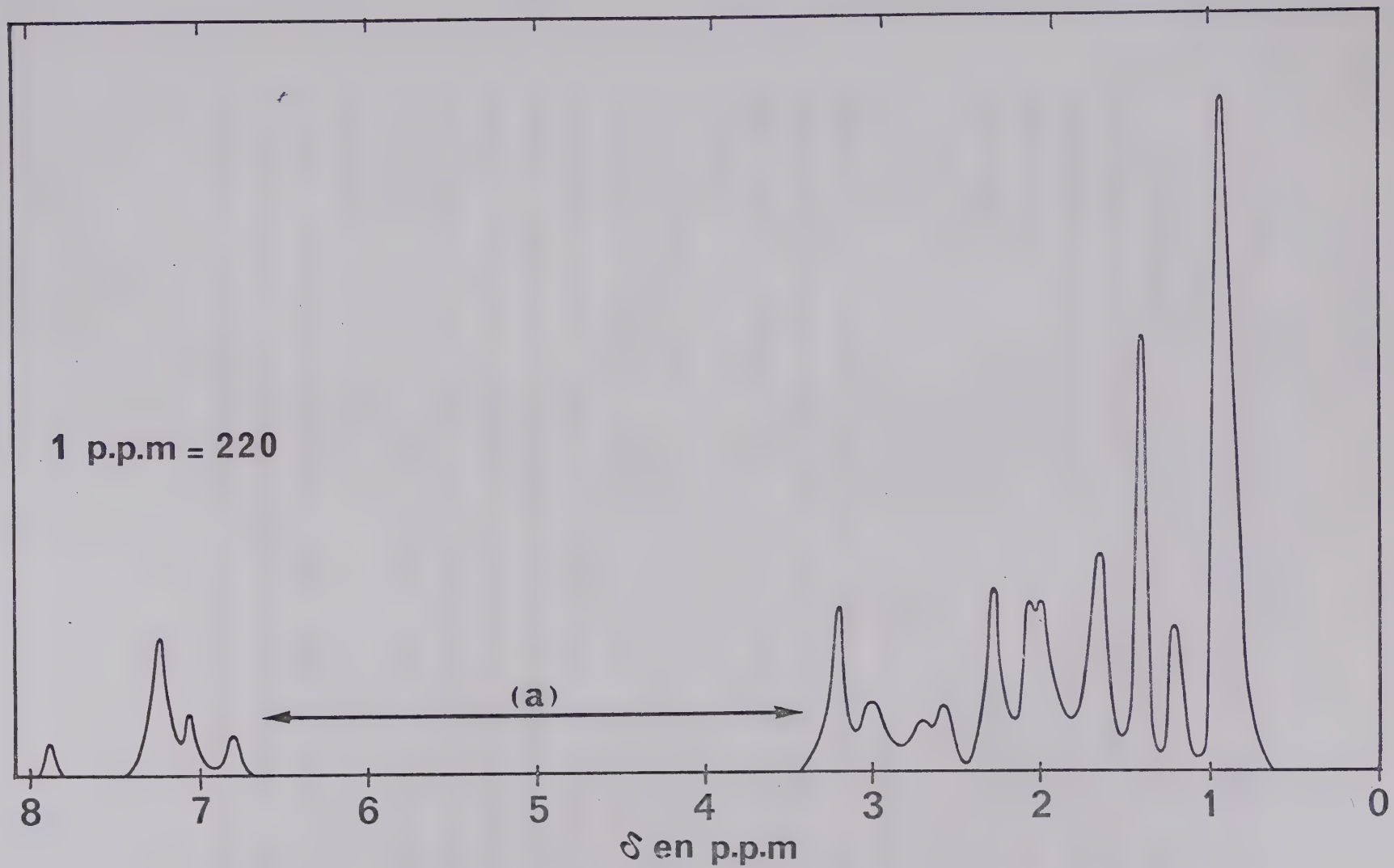


Figure 22 : Spectre de résonance magnétique nucléaire à 220 mHZ, calculé à partir du spectre de R.M.N. de la protéine dénaturée par l'acide trifluoroacétique.

c - En présence d'un ligand, inhibiteur compétitif (oestradiol).

La figure 23 montre le spectre R.M.N. de l'isomérase en présence d'oestradiol. Le spectre R.M.N. de l'oestradiol n'interfère pas avec celui de l'isomérase. On observe que les régions de 1 à 3,5 p.p.m. et de 4,5 à 6,3 p.p.m. sont modifiées. Le spectre du complexe est déplacé vers de plus basses fréquences par rapport à la protéine native. On voit donc que l'environnement électronique de la plupart des résidus amino-acides qui contribuent au spectre R.M.N. est modifié. Le déplacement des pics se fait dans le même sens que dans le passage de la forme dénaturée vers la forme native.

La méthode R.M.N. à haute résolution nous a donc permis d'observer un petit nombre de résidus lors d'une transconformation ou d'une interaction avec un ligand. Des études faites par dispersion optique rotatoire sur la sérum albumin en présence de testostérone, avaient également montré l'existence des transitions conformationnelles vers une structure plus compacte, liées à l'interaction stéroide-protéine (44).

Ces différentes méthodes nous suggèrent que l'isomérase à l'état natif a une conformation secondaire et tertiaire ordonnée, probablement avec une forte proportion en β.

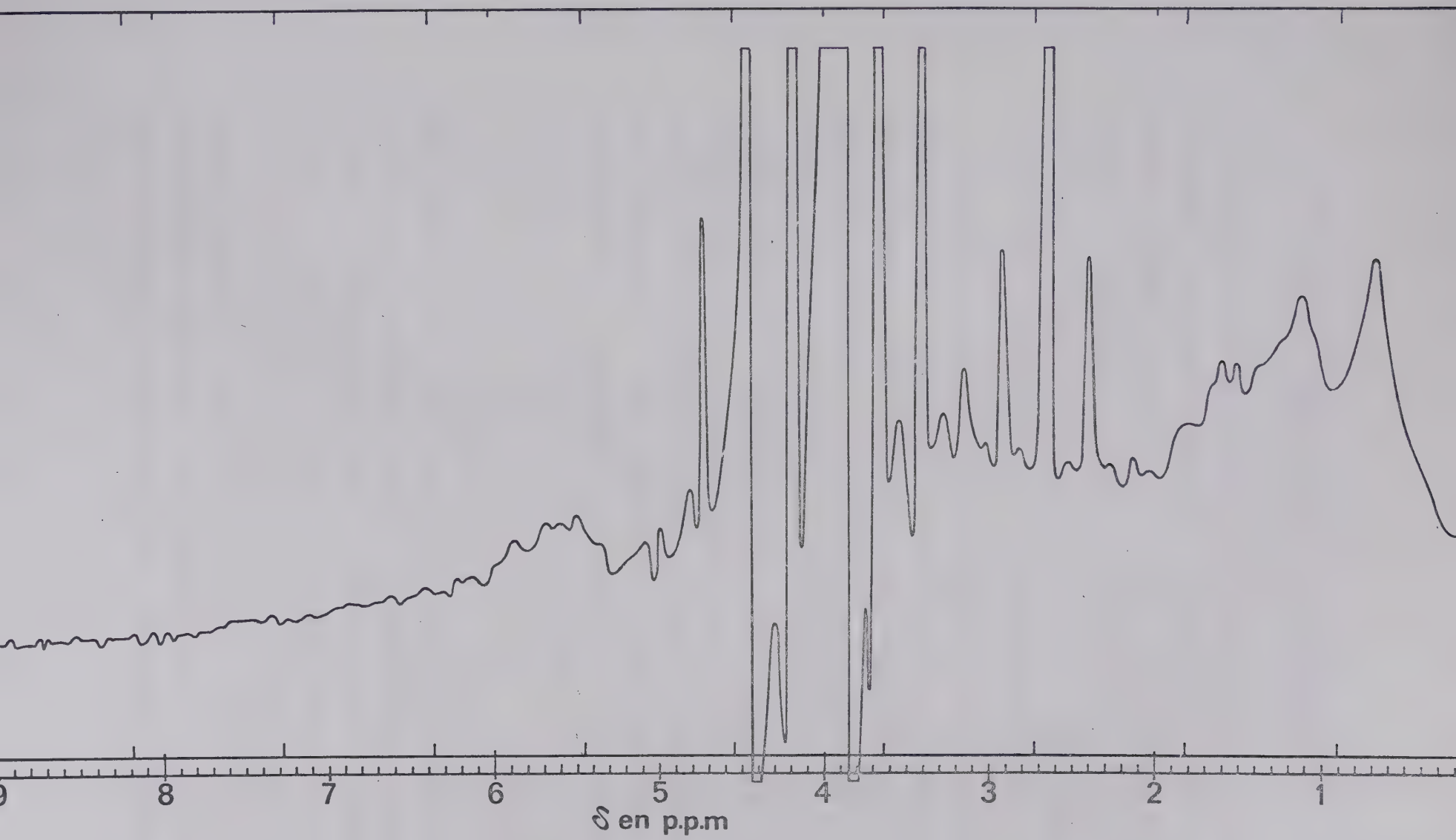


Figure 23 : Spectre de résonance magnétique nucléaire à 220 MHZ, d'une solution d'isomérase 10 mg/ml et d'oestradiol $1,25 \times 10^{-5}$ M dans l'eau lourde, pD 7,0.

CHAPITRE V : SOUS-UNITES DE L'ISOMERASE

Nous avons vu que Talalay (5) a déterminé la séquence primaire d'une sous-unité de l'isomérase de poids moléculaire 13.600 . Dans ce travail nous avons dissocié l'isomérase et déterminé le poids moléculaire de la sous-unité par électrophorèse sur disque en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (S.D.S.).

Nous avons appliqué la méthode décrite par Weber et Osborne (45) ; l'isomérase a été dissociée par chauffage au bain marie à 37° pendant 2 heures en présence de dodécylsulfate de sodium à 1 % v/v. La concentration finale en isomérase était de 0,0115 mg. On détermine ensuite de poids moléculaire de l'isomérase ainsi dissociée, en la faisant migrer sur gel de polyacrylamide en présence de S.D.S. 1 % v/v. On établit simultanément une droite de référence avec des protéines de poids moléculaire connu, en portant leur mobilité électrophorétique en fonction du logarithme du poids moléculaire. En portant ensuite sur cette droite de référence la mobilité électrophorétique de l'isomérase dans les mêmes conditions expérimentales, on détermine le log du poids moléculaire de la sous-unité. La figure 24 montre cette représentation. L'isomérase se place légèrement au dessus du lysozyme. On obtient ainsi pour la sous-unité de l'isomérase 14.000 $\pm$ 10 %. Cette valeur est proche du tiers du poids moléculaire obtenu par Talalay (5) ce qui impliquerait 3 sous-unités par mole. Cette détermination a été effectuée au laboratoire des Etats Liés Moléculaires, en collaboration avec Monsieur T. Nguyen que nous remercions vivement.

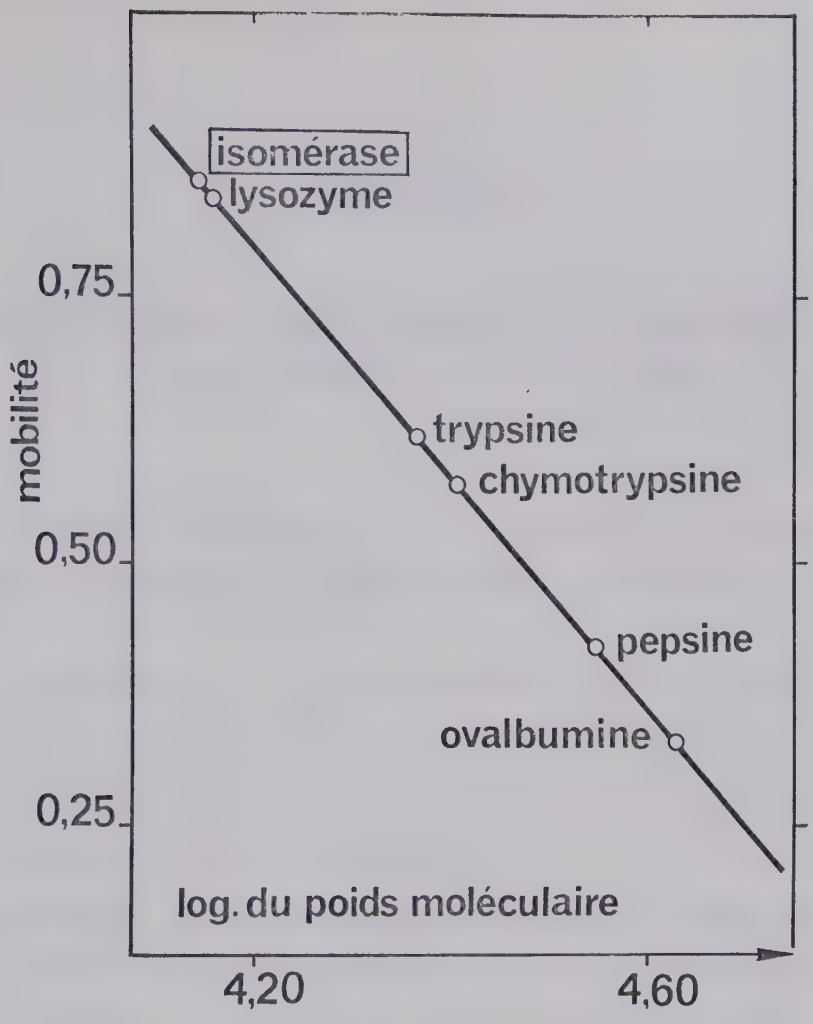


Figure 24 : Mobilité électrophorétique en fonction du logarithme du poids moléculaire pour les protéines de référence et l'isomérase.

Les électrophorèses sur disque en gel de polyacrylamide ont été effectuées sur des gels contenant 10 % d'acrylamide et 0,3 % de bisacrylamide et 1 % de dodécylsulfate (45). Les gels ont été colorés par le bleu de Coomassie.

CHAPITRE VI

CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DE L'ISOMERASE LIEES A SON CONTENU EN AMINO ACIDES.

A - Structure tertiaire de l'isomérase en relation avec sa composition en amino acides polaires et non polaires.

A partir de l'hypothèse généralement admise (46) que dans une protéine native en solution aqueuse, les résidus apolaires sont situés à l'intérieur de la molécule protéique (environnement hydrophobe), et que les résidus polaires occupent la surface protéique extérieure, Waugh a défini (47) pour une molécule protéique un volume extérieur "Ve" constitué par les résidus amino acides polaires, de solubilité limitée en milieu hydrophobe, et un volume intérieur "Vi" constitué par les résidus apolaires de solubilité limitée en milieu aqueux. Fischer (48) utilisant toutes ces données suggère qu'il pourrait exister une relation entre la conformation tertiaire et quaternaire de la protéine de poids moléculaire et de volume spécifique connus et la proportion des résidus polaires et apolaires. "Cette loi limite" imposerait certaines restrictions quant à la forme et à la taille de la molécule protéique.

Le rapport "Ve/Vi" représente le rapport de polarité "p" des résidus amino-acides de la chaîne polypeptidique.

Ce rapport "p" est calculé à partir du volume spécifique de chaque résidu amino-acide pour une protéine de poids moléculaire donné. On considère ensuite un cas idéal : l'assimilation de la molécule protéique donnée à une sphère de rayon r. Le volume total de cette sphère "Vt" est :

$Vt = Ve + Vi = \frac{4\pi r^3}{3}$ (1) ce qui permet de calculer r.

Si d est l'épaisseur de la couche extérieure hydrophile, $d \simeq 4$ Å, car cette épaisseur correspond à la dimension des atomes constituant les acides aminés, d'une chaîne latérale, d est par conséquent indépendant de la taille de la molécule. On a alors :

$$Ve = \frac{4\pi}{3} r^3 - (r-d)^3 \qquad (2)$$

et

$$Vi = \frac{4\pi}{3} (r-d)^3 \qquad (3)$$

Le rapport de polarité idéal "p_s" qui en résulte est déduit à partir des équations (2) et (3)

$$p_s = \frac{r^3}{(r-d)^3} - 1$$

On définit ensuite le rapport p/p_s, appelé l'asphéricité de la molécule. Si $p = p_s$, la molécule a la conformation idéale d'une sphère compacte et imperméable au solvant, ce qui est rare.

Pour une molécule protéique de volume total donné, il existe une seule valeur de "p_s" correspondant à un modèle idéal avec une couche hydrophile externe complète et un intérieur hydrophobe. La déviation par rapport au cas idéal dépendra de l'écart de la valeur de "p" par rapport à "p_s".

Si $p < p_s$, le nombre des résidus non polaires est en excès par rapport à la valeur idéale, il en résulte que la couche externe n'étant plus recouverte par les groupes polaires, la surface non polaire d'une molécule aura tendance à s'associer à la surface hydrophobe d'une autre molécule pour éviter la phase aqueuse, la molécule protéique aura tendance à l'agrégation.

Si $p > p_s$ (ceci correspond au cas où le nombre des résidus polaires est supérieur aux résidus apolaires), la molécule s'allongera pour prendre une forme de batonnet et permettre à tous groupes polaires d'être en contact avec la phase aqueuse.

Application à l'isomérase

Nous avons pris le volume spécifique de chaque acide aminé dans la table (47). Connaissant la composition en amino-acides de l'isomérase, nous avons admis avec Talalay (5) que la protéine est constituée de 3 sous-unités identiques possédant le même NH_2 terminal : (la méthionine), et le même COOH terminal : (l'alanine). Nous avons compté ces six résidus parmi les groupes polaires. Dans ces conditions (49) :

$Ve = 18.795\ \mathring{A}^3$ $\quad Vi = 16.290\ \mathring{A}^3$ $\quad V_t = Ve+Vi = 35.085\ \mathring{A}^3$

d'où : $Ve/Vi = p = 1,15$

Nous avons ensuite assimilé la molécule d'isomérase à une sphère de rayon r, de volume total V_t

$r = 20,4$ Å et si $d = 4$ Å

$p_s = 0,92$

$p/p_s = 1,26$

Donc $p > p_s$, la molécule n'est pas sphérique, elle aura tendance à s'aplatir , pour permettre à tous les groupes polaires de l'isomérase de venir en contact avec le solvant aqueux.

Nous avons déterminé le pourcentage des amino-acides hydrophobes et hydrophiles par mole d'isomérase (49), et il est respectivement de 46,4 % et 53,6 %.

Il y a une majorité de groupes polaires dans l'isomérase et une des conséquences en est sa grande solubilité en milieu aqueux. Cependant le calcul de Fischer n'est qu'une approximation. En effet : d'une part, nous n'avons pas tenu compte dans le calcul de V_e du volume spécifique des tyrosines et phénylalanines qui sont en contact avec le solvant; nous les avons comptés parmi les amino-acides non polaires. D'autre part, grâce aux études de diffraction aux rayons X, on connait aujourd'hui la structure fine d'un grand nombre des protéines, en particulier le lysozyme (28), la ribonucléase (50) et la myoglobine (51). Ces études montrent qu'un grand

nombre de résidus apolaires sont à la surface ou plus ou moins près de la surface protéique, et qu'il n'y a pas de distribution binaire parfaite entre la surface et l'intérieur protéique. En particulier on sait qu'un grand nombre de prolines sont à la surface protéique.

La subtilisine est une exception ; Wright (52) propose pour cette protéine une distribution binaire parfaite. Pour toutes ces raisons le modèle proposé par Fischer est un modèle trop simple.

B - Calcul du volume spécifique partiel $\bar{V}p$ de l'isomérase pour 375 résidus amino-acides.

Pour les protéines, le volume spécifique partiel $\bar{V}p$ dépend essentiellement de la composition en amino-acides; il s'exprime en ml/g. C'est donc le volume occupé en ml par g de protéine.

$\bar{V}p$ est défini à température et à pression constantes par :

$$\bar{V}p = \left(\frac{\partial V}{\partial m_p}\right)_{m_s \; T.P.}$$

V est le volume total de la solution, m_p et m_s sont respectivement les masses de la protéine et du solvant. Cependant, ce que l'on mesure est un volume spécifique partiel apparent $\bar{V}p_{app.}$, qui est confondu avec le volume partiel spécifique pour des solutions diluées.

$\bar{V}p$ permet la détermination de la masse moléculaire d'une protéine, connaissant sa vitesse de sédimentation et le coefficient de diffusion.

Nous avons déterminé le $\bar{V}p_{app.}$ de l'isomérase d'après les données de Cohn et Edsall (53).

1) Détermination de $\bar{V}p$ à partir du volume molèle ($\bar{\Phi}_p$) de l'isomérase.

Pour l'isomérase le $\bar{\Phi}_p$ s'obtient à partir de la somme des volumes molèles $\bar{\Phi}_i$ de chacun des résidus d'amino acide qui la constituent. Si Mp est le poids moléculaire de l'isomérase, elle contient n_i moles d'un résidu d'acide aminé donné de poids moléculaire M_i.

$$\bar{\Phi}_p = \Sigma_i \, n_i \, \bar{\Phi}_i$$

$$M_p = \Sigma_i \, n_i \, M_i$$

$$\bar{V}p = \frac{1}{\rho_p} = \frac{\bar{\Phi}_p}{Mp} = \frac{\Sigma_i \, n_i \, \bar{\Phi}_i}{\Sigma_i \, n_i \, M_i}$$

ρ_p est la densité apparente de la molécule protéique, elle s'exprime en g/ml. En appliquant cette méthode de calcul nous avons obtenu pour l'isomérase :

$\bar{V}p$ = 0,760 ml/g

ρ_p = 1.315 g/ml

2) Calcul de $\bar{V}p$ à partir des volumes spécifiques, Vi de chaque résidu amino-acide de l'isomérase.

Si Wi est le poids pour cent d'un résidu amino-acide de l'isomérase et Vi le volume spécifique correspondant

$$\bar{V}p = \frac{\sum i \; Vi \; Wi}{100}$$

A partir de cette méthode de calcul on obtient :

$\bar{V}p = 0,731$ ml/g

$\rho p = 1,365$ g/ml

La valeur moyenne de $\bar{V}p$ et de ρp obtenue à partir de ces deux méthodes de calculs sont respectivement de :

$\bar{V}p_m = (0,760 + 0,731)/2$ ml/g (la précision sur $\bar{V}p_m$ est de 0,015 ml/g) soit :

$\bar{V}p_m = 0,745 \pm 0,015$ ml/g

$\rho p_m = (1,315 + 1,365)/2$ g/ml (la précision sur ρp_m est de 0,025 g/ml) soit :

$\rho p_m = 1,340 \pm 0,025$ g/ml.

Cette valeur de $\bar{V}p_m$ est légèrement différente de celle qui est donnée par Talalay (1). Ceci peut s'expliquer par le fait que le nombre des résidus d'amino-acides qu'il a utilisé pour ce calcul (4) diffère légèrement de celui que nous avons employé d'après la séquence primaire complète publiée récemment par Talalay (5). De toute façon, si l'on tient compte de la précision des calculs, ces deux valeurs de $\bar{V}p_m$: de 0,734 (4) et de $0,745 \pm 0,015$ mg/g peuvent être considérées comme très voisines.

2ème PARTIE

-:-:-:-:-:-:-

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU MECANISME D'ISOMERISATION DES Δ^5 ET $\Delta^{(5,10)}$ 3-OXOSTEROIDES PAR L'ISOMERASE DE PSEUDOMONAS TESTOSTERONI

PARTICIPATION DU SOLVANT.

CHAPITRE I

CINETIQUE D'ISOMERISATION AU pH OPTIMUM

A - RAPPELS THEORIQUES

Dans un système homogène en solution, une réaction enzymatique peut être décrite par le schéma le plus simple (53) :

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_s} E + P \qquad (1)$$

L'enzyme libre "E" et le substrat libre "S" s'unissent réversiblement pour donner un complexe intermédiaire non covalent "ES" (complexe de Michaëlis), puis ce complexe se décompose irréversiblement en libérant l'enzyme et les produits de la réaction "P" ; k_1, k_2 et k_s sont respectivement les constantes de vitesse de formation, de dissociation et de décomposition du complexe intermédiaire.
A l'état stationnaire, en supposant la concentration en enzyme négligeable devant celle du substrat, on obtient

l'expression de la vitesse de transformation :

$$v_i = \frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} = \frac{k_s e_o s_o}{K_m + s_o} \qquad (1)$$

e_o et s_o sont les concentrations totales d'enzyme et de substrat au moment initial de la réaction enzymatique. "K_m" est la constante de Michaëlis; elle est égale à $\frac{k_2 + k_s}{k_1}$. Si $k_s \ll k_2$, K_m est assimilable à l'inverse de l'affinité du substrat pour l'enzyme ($\frac{k_2}{k_1}$). Pour des concentrations en substrat élevées v_i tend vers $k_s e_o$ vitesse maximum "V_m" de la réaction.

- Détermination expérimentale de K_m et de V_m

Un procédé graphique est utilisé pour la détermination de K_m et de V_m.

L'équation (1) peut s'écrire sous la forme :

$$1/v_i = \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m}$$

On mesure les vitesses initiales v_i à différentes concentrations en substrat et on porte $1/v_i$ en fonction de 1/S. Lorsque la cinétique suit la loi de Michaëlis, on obtient une droite de pente K_m/V_m, dont l'intersection avec l'axe des abscisses est $-1/K_m$ et l'ordonnée à

l'origine $1/V_m$. C'est la représentation de Lineweaver et Burk (55) que l'on appelle courbe des doubles inverses. Nous l'utiliserons au cours de ce travail.

- LES INHIBITEURS COMPETITIFS

Différents inhibiteurs compétitifs ont été utilisés pour apporter des renseignements sur le mécanisme d'action de l'isomérase. Ces renseignements concernent la première étape de la réaction enzymatique, à savoir, la formation du complexe enzyme-substrat.

Les inhibiteurs compétitifs sont des composés qui ont en général une grande analogie de structure avec les substrats, et se lient sur le même site de fixation. Le substrat et l'inhibiteur sont mutuellement exclusifs. L'inhibiteur compétitif se comporte comme un substrat artificiel. Un grand excès de substrat peut déplacer l'inhibiteur, mais la concentration nécessaire dépendra des affinités respectives pour l'enzyme.

Pour définir le système, on peut écrire les équations suivantes :

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_s} E + P$$

$$E + I \underset{k_2'}{\overset{k_1'}{\rightleftharpoons}} EI$$

Si $k_s \lesssim k'_2$ on a alors :

$$\frac{(E)\ (S)}{(ES)} = K_m \quad ; \quad (E) = \frac{(ES)}{(S)} K_m \quad ; \quad (ES) = \frac{(E)\ (S)}{K_m}$$

$$K_i = \frac{(E)\ (I)}{(EI)} ; \quad (ES) = \frac{K_i}{K_m} \frac{(EI)\ (S)}{(I)} ; \quad (EI) = \frac{(E)(I)}{K_i} = \frac{(ES)}{(S)} x \frac{K_m (I)}{K_i} ;$$

On suppose que le complexe EI est inactif, et que EIS ne peut se former ; seul est actif le complexe ES

$$v_i = k_s\ (ES)$$

$$V_m = k_s e_o$$

$$v_i / V_m = \frac{(ES)}{e_o}$$

$$e_o = (E)_{libre} + (EI) + (ES),$$

En présence d'inhibiteur, la vitesse initiale v'_i est donc donnée par l'équation :

$$v'_i = \frac{k_s\ e_o \cdot s_o}{K_m (1 + \frac{(I)}{K_i}) + s_o} \qquad (2)$$

(I) est la concentration en inhibiteur libre; elle est égale à la concentration totale en inhibiteur. On suppose en effet que (I) est en excès par rapport à la concentration

en enzyme, ce qui est toujours le cas avec l'isomérase car on utilise des faibles concentrations de l'ordre de 10^{-10} M en isomérase.

K_i est la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur, c'est donc une vraie constante d'équilibre. L'effet de l'inhibiteur compétitif est de produire un accroissement du K_m apparent, qui est multiplié par un facteur de $(1 + \frac{(I)}{K_i})$. La vitesse maximum n'est pas changée.

Détermination expérimentale de K_i

On utilise la représentation de Dixon (56) obtenue à partir de l'équation (2) transformée, qui peut s'écrire :

$$1/v'_i = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m S} + \frac{K_m I}{V_m K_m S}$$

où v'_i est la vitesse en présence de l'inhibiteur. En portant $1/v'_i$ en fonction de la concentration en (I), on obtient un faisceau de droites, une droite pour chaque concentration en substrat; quand S est très grand, les termes en $\frac{1}{S}$ s'annulent, la vitesse (v'_i) devient indépendante de la concentration en inhibiteur et est alors égale à V_m. Il s'ensuit que la droite correspondante est parallèle à l'axe des abscisses. Ces droites convergent en un point dont l'abscisse est égale à $-K_i$. C'est donc l'intersection de la droite $1/V_m$

avec chacune des droites du faisceau. Il faut donc que

$$1 + \frac{I}{K_i} = 0 \quad , \quad \text{soit } I = - K_i$$

En modifiant certaines caractéristiques de l'inhibiteur on peut trouver une structure plus ou moins favorable à l'interaction. On admet que le substrat se comporterait d'une façon parallèle. Ceci permet donc d'apporter des renseignements sur des groupes indispensables à la liaison protéine-stéroide.

B - MATERIEL ET METHODES

1 - Les stéroides : tous les stéroides utilisés dans ce travail sont des produits Roussel-UCLAF. Ils sont en solution dans des solvants organiques en raison de leur faible solubilité dans l'eau. Les formules de tous les stéroides utilisés dans ce travail sont données sur le tableau V.

2 - L'enzyme : pour les études cinétiques, les dilutions sont effectuées soit en présence de serum albumine bovine (SAB) à 1 g/100 ml à pH 7,0, soit en présence de tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0. Les solutions enzymatiques ont des activités finales de l'ordre de 0,01 à 0,5 unités/ml correspondant à une concentration de $4,10 \times 10^{-12}$ à $2,05 \times 10^{-10}$ M.

3 - Mesures cinétiques, détermination de K_m, V_m et K_i.

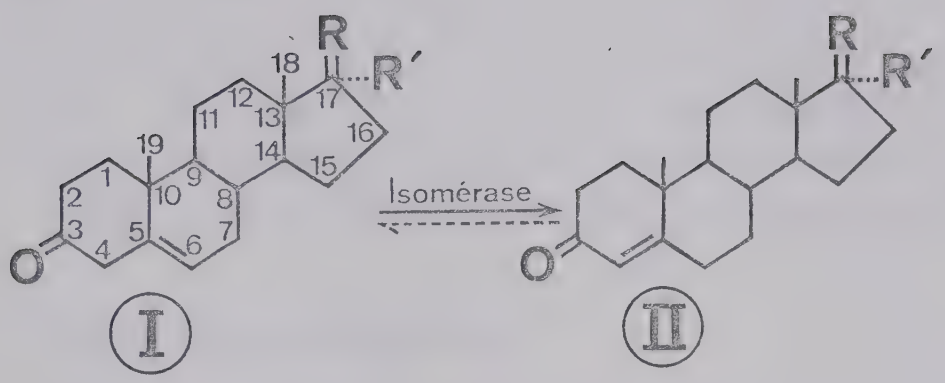
Le principe de la mesure spectrophotométrique est décrit dans le chapitre "Purification de l'isomérase" (pages 16 et 17). La cuve de mesure de 3 ml de volume final contient : le tampon, les stéroides (substrat seul ou substrat + inhibiteur) et l'enzyme. La cuve de référence contient tous les réactifs sauf la solution de stéroide que l'on remplace par une quantité équivalente de solvant organique. La vitesse initiale "v_i" de la réaction d'isomérisation est donnée par la variation de l'absorbance à 248 nm par minute. On calcule v_i à partir des pentes des courbes dans la zone linéaire.

Les conditions expérimentales sont :

- pH final 7,0 (tampon phosphate de potassium 0,03 M, ou tampon tri(hydroxyméthyl)aminométhane et acide chlorhydrique (Tris, HCl) 0,03 M).
- La température est contrôlée pendant toute la durée de l'expérience.
- Les concentrations en solvant organique seront indiquées dans chaque expérience.

C - APPLICATION A L'ISOMERASE

La réaction d'isomérisation des Δ^5 et $\Delta^{(5,10)}$ 3-oxostéroides substrats de l'isomérase, peut être décrite par le schéma général suivant :



I est la formule générale du stéroide, substrat de l'isomérase (la double liaison pouvant être entre 5 et 6 ou 5 et 10).

II est celle du produit de la réaction, après le transfert du proton de la position 4β-axiale vers la position 6β-axiale.

Cette réaction d'isomérisation étant très rapide (activité moléculaire spécifique 17.10^6 min^{-1}), l'existence des complexes intermédiaires n'a pu être démontrée. Cependant Ringold suggère la formation d'un énol dans un complexe

intermédiaire et démontre que le transfert de proton est l'étape limitante (3). Nous admettrons avec Ringold ces deux données essentielles dans tout le travail qui suivra. Nous utiliserons l'équation (1) qui correspond au schéma le plus simple ; k_s devient l'étape limitante, $k_s \ll k_2$ et $K_m = \frac{k_2}{k_1}$ peut être assimilé à une constante d'équilibre et représente l'inverse de l'affinité du substrat pour l'enzyme ; k_s est appelée constante catalytique : k_{cat}.

D - RESULTATS EXPERIMENTAUX

1 - Variation de la vitesse initiale v_i en fonction de la concentration en isomérase.

Nous avons abordé cette étude en vérifiant la proportionnalité entre les vitesses initiales "v_i" et la concentration en isomérase et ceci à plusieurs pH et à plusieurs concentrations en substrat. Entre pH 6,0 et pH 8,0, cette proportionnalité existe entre $1,0 \times 10^{-3}$ u/ml et 5×10^{-2} u/ml. Aux pH plus acides, ou plus alcalins, on observe cette proportionnalité jusqu'à 0,5 u/ml.

2 - Effet de la force ionique à pH 7,0.

La force ionique a été modifiée, soit en faisant varier les concentrations des solutions tampons (Tris, HCl) et tampon phosphate de potassium, entre 0,02 M et 2,0 M, soit par addition de molarités croissantes de KCl, ou NaCl,

TABLEAU VI

Comparaison des paramètres cinétiques K_m et k_{cat} pour l'isomérisation de la 5-androstènedione et la 5-prégnènedione en méthanol 13,3 % v/v à pH 7,0 et à 25° C.

Paramètres cinétiques	5-androstènedione	5-pregnènedione
K_m est exprimé en moles/litre	$9,1 \times 10^{-4}$	$0,9 \times 10^{-4}$
k_{cat} est exprimé en moles de substrat transformé par mole d'enzyme et par sec	$0,99 \times 10^{5}$	$1,1 \times 10^{5}$

Les expériences ont été effectuées en tampon Tris, HCl 0,03 M.

TABLEAU VII

Comparaison des paramètres cinétiques K_m et k_{cat} pour l'isomérisation de la 5-androstènedione et la 5-prégnènedione en butanol normal 0,304 M à pH 7,0 et à 25°C.

Paramètres cinétiques	5-androstènedione	5-prégnènedione
K_m est exprimé en moles par litre	$3,12 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-5}$
k_{cat} est exprimé en moles de substrat isomérisé par mole d'enzyme et par sec.	$1,53 \times 10^{4}$	$6,60 \times 10^{4}$

entre 0,02 M et 4 M. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé de variation de vitesse d'isomérisation de la Δ^5-androstène-3,17-dione et de la Δ^5-pregnène-3,20-dione.

3 - Spécificité des stéroides substrats et inhibiteurs compétitifs.

a - Influence de la chaîne latérale en 17β pour les substrats.

Cette étude a été effectuée avec deux substrats : l'un, la Δ^5-androstène-3,17-dione (Δ^5A), s'obtient en remplaçant R par O= dans la formule générale (I), l'autre, la Δ^5-pregnène-3,20-dione (Δ^5P) où R est remplacé par $-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-CH_3$; dans des conditions expérimentales identiques, en tampon Tris, HCl 0,03 M, pH 7,0, KCl 0,1 M et à 21° C, en méthanol 13,0 % v/v. Les valeurs de k_{cat} et de K_m sont données dans le tableau VI.

Le tableau VII donne les valeurs de K_m et k_{cat} pour l'isomérisation de la Δ^5A et Δ^5P en butanol normal 0,304 M à pH 7,0, en tampon phosphate 0,03 M (KCl 0,1 M) et à 25°C.

Le tableau VI montre qu'en méthanol 13 % le k_{cat} de la Δ^5P est 1,18 fois supérieure à celle de la Δ^5A, et que les affinités diffèrent d'un facteur de 10. Le tableau VII montre qu'en butanol 0,304 M le k_{cat} de la Δ^5P est 4,35 fois supérieur à celui de la Δ^5A et que les affinités diffèrent d'un facteur de 15,6.

Ces données permettent de conclure que l'allongement de la chaîne latérale en 17β augmente à la fois l'affinité et le k_{cat} de la réaction d'isomérisation ; la Δ^5P est un

meilleur substrat que la Δ^5A. Ceci est confirmé par la valeur de l'énergie libre de dissociation du complexe de Michaëlis.

En méthanol 10 % v/v à 25° C et à pH 7,0, le K_m pour la Δ^5A est de 7,15 x 10^{-4} M et l'énergie libre de dissociation ΔG_{K_m} = 4320 cal/mole. Le K_m pour la Δ^5P est de 5 x 10^{-5} M et la ΔG_{K_m} = 5920 cal/mole. Or le caractère hydrophobe de la Δ^5P est plus prononcé que celui de la Δ^5A, et ceci suggère la participation des interactions hydrophobes dans la réaction d'isomérisation.

Lorsque R = C_8H_{17}, le dérivé correspondant est la cholesténone, composé très hydrophobe, très peu soluble en solution aqueuse. Il a été dissous dans le dioxane, mais son isomérisation enzymatique n'a pu être mise en évidence. L'absence d'isomérisation n'est pas due à l'insolubilité du substrat. Des empêchements stériques pourraient défavoriser son isomérisation. Nous n'avons pas pu étudier des stéroides de C_{21} à C_{27}.Nous avons pensé que la proximité d'un oxygène par rapport au C_{17} était indispensable.Cependant Jones et Wigfield (57) ont utilisé un substrat où R est un hydrogène,en 27% v/v de méthanol;sa vitesse initiale d'isomérisation est supérieure à celle de la Δ^5A prise comme référence. Il semble donc que la proximité de l'oxygène n'est pas nécessaire, et qu'au contraire, son absence favorise l'isomérisation. Cependant cette expérience a été

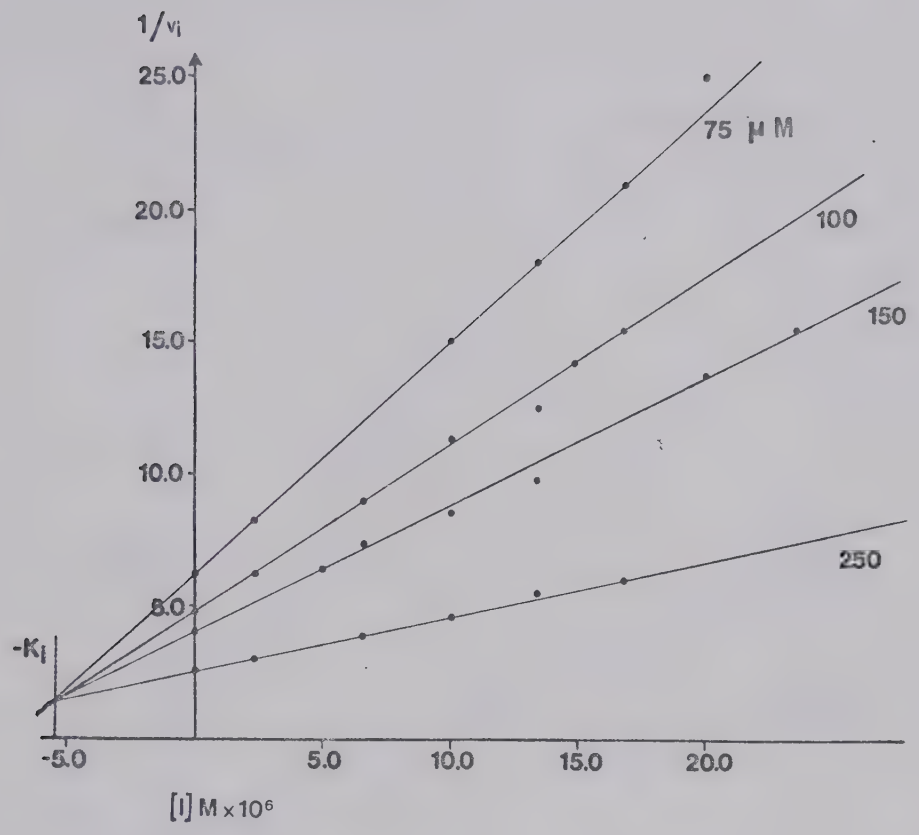


Figure 25

Inhibition de l'isomérisation de la 5-androstènedione par l'oestradiol. Représentation de Dixon. Les expériences sont effectuées à 25°C, en tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0 et méthanol 3,3 % (v/v), 4 concentrations en substrats sont utilisées. La concentration en isomérase varie de $0,8 \times 10^{-2}$ à $5,4 \times 10^{-1}$ unités/ml. v_i est exprimé par $\frac{\Delta DO\ 248\ nm}{minute}$.

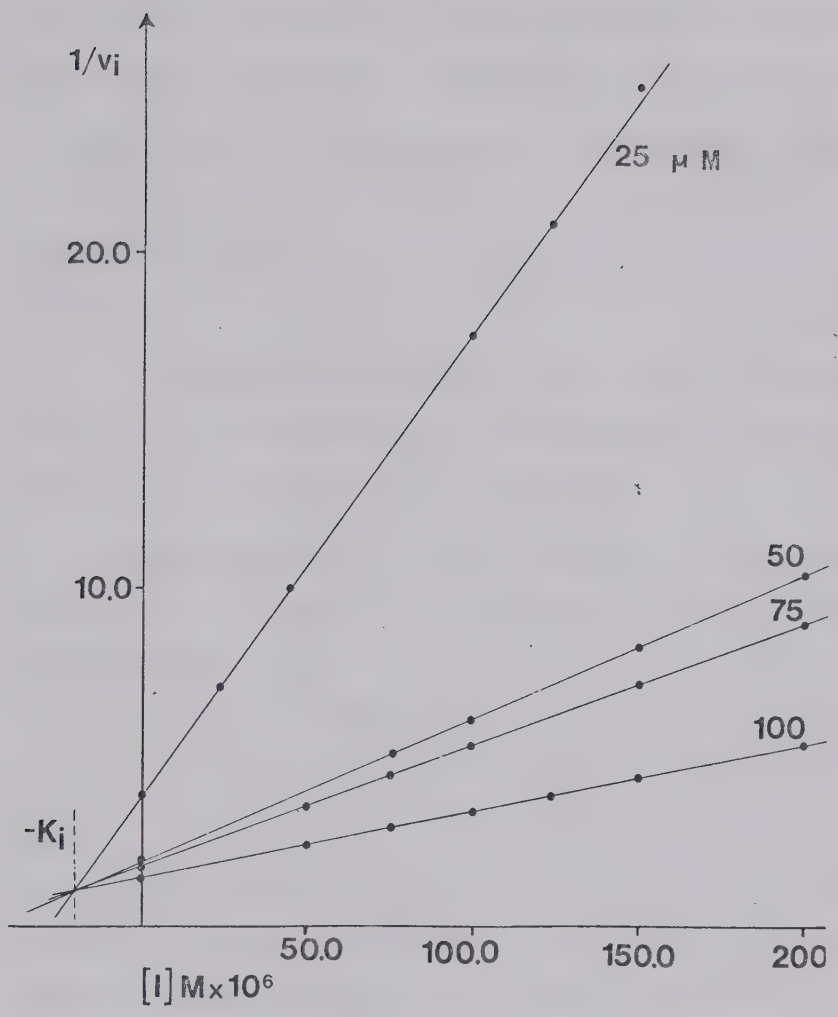


Figure 26

Inhibition de l'isomérisation de la 5-androstènedione par l'oestradiol. Représentation de Dixon. Les expériences sont effectuées à 25° C, en tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0 et méthanol 10 % (v/v) ; 4 concentrations en substrat ont été utilisées. La concentration de l'isomérase varie de 10^{-2} à $7,10^{-1}$ unités/ml. v_i est exprimé en $\frac{\Delta DO\ 248\ nm}{minute}$.

effectuée à une seule concentration en substrat, et on ne sait quels sont les paramètres cinétiques affectés.

b - Dérivés de l'oestradiol inhibiteur compétitif.

L'effet de la suppression de l'oxygène en C_{17} a été étudié en présence d'un inhibiteur compétitif le 17-déoxy oestradiol. En méthanol 10 % v/v son K_i est de $2,6 \times 10^{-6}$ M. Dans les mêmes conditions le K_i de l'oestradiol est de 20.10^{-6} M. Ce résultat indique que la suppression de l'oxygène en C_{17} favorise la liaison.

Les figures 25 et 26 montrent la représentation de Dixon en présence d'oestradiol et de Δ^5A comme substrat, en méthanol 3,3 et 10 % v/v.

Le tableau VIII donne les K_i pour l'oestradiol, le 17α-oestradiol, et le 17-acétate d'oestradiol à pH 7,0 et à 25° C, en 5 et 10 % v/v de méthanol.

Le tableau IX donne les K_i en présence de dioxane 10 % v/v (dans les mêmes conditions expérimentales, seul varie le solvant). D'après ces 2 tableaux on voit que pour une même concentration en solvant organique (méthanol ou dioxane), le K_i décroît, donc l'affinité croît de l'oestradiol au 17-acétate d'oestradiol en passant par 17α-oestradiol. Cette augmentation de l'affinité est parallèle à l'accroissement de leur moment dipolaire μ exprimé en unités Debye (58).

Oestradiol (μ = 2,33) < 17α-oestradiol (μ = 2,56) < 17-acétate d'oestradiol (μ = 2,61).

TABLEAU VIII

Valeurs de constantes d'inhibition K_i, pour l'oestradiol (O_{II}), le 17α-oestradiol ($17\alpha\text{-}O_{II}$), et le 17-acétate d'oestradiol ($17\text{-}Ac\text{-}O_{II}$) en présence de méthanol.

méthanol % v/v	O_{II}	$17\alpha\text{-}O_{II}$	$17\text{-}Ac\text{-}O_{II}$
5,0	$10,0 \times 10^{-6}$	$4,3 \times 10^{-6}$	$0,35 \times 10^{-6}$
10,0	$20,0 \times 10^{-6}$	$8,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$

Les expériences ont été effectuées en tampon phosphate de potassium 0,03 M, pH 7,0 et à 25° C, en présence de 5-androstènedione comme substrat.

TABLEAU IX

Valeurs des constantes d'inhibition K_i pour l'oestradiol (O_{II}), le 17α-oestradiol ($17\alpha\text{-}O_{II}$) et le 17-acétate d'oestradiol ($17\text{-}Ac\text{-}O_{II}$) en présence de dioxane.

dioxane 10 % v/v	O_{II}	$17\alpha\text{-}O_{II}$	$17\text{-}Ac\text{-}O_{II}$
K_i est exprimé en moles/litre	$1,8 \times 10^{-4}$	$0,15 \times 10^{-4}$	$0,012 \times 10^{-4}$

Les expériences ont été effectuées en tampon phosphate de potassium 0,03 M, pH 7,0 et à 25° C en présence de 5-androstènedione comme substrat.

4 - Dérivés 19-nor substrats ou inhibiteurs compétitifs

Nous avons comparé les K_m et les k_{cat} de la Δ^5A et de la 19-nor-Δ^5A.

En méthanol 3,3 % v/v et à pH 7,0, ces paramètres sont donnés dans le tableau X. On voit que la suppression du méthyl en 19 augmente l'affinité pour l'enzyme, par contre le k_{cat} est diminué mais très peu. Cette augmentation de l'affinité est vérifiée en comparant les K_i de deux inhibiteurs compétitifs : la testostérone ; $K_i = 150 \times 10^{-6}$ M et la 19-nor-testostérone : $K_i = 35 \times 10^{-6}$ M (en méthanol 10 % v/v à 25° C et à pH 7,0).

5 - Dérivés $\Delta^{5,6}$ et $\Delta^{(5,10)}$ (substrats).

Nous avons comparé les vitesses v_i d'isomérisation de la 19-nor $\Delta^{5,6}$A et de la 19-nor $\Delta^{5,10}$A, à une concentration 25×10^{-6} en substrat, à pH 7,0 et à 25° C; la 19-nor $\Delta^{5,10}$ s'isomérise 1000 fois plus lentement que la 19-nor Δ^5A.

En conclusion, il semble que l'absence de méthyl favorise la fixation. Avec les dérivés de l'oestradiol l'affinité varie dans le même sens que leur moment dipolaire. Dans cette série d'inhibiteurs compétitifs, les interactions électrostatiques semblent jouer un rôle important.

TABLEAU X

Comparaison des paramètres cinétiques K_m et k_{cat} pour l'isomérisation de la 5-androstènedione et la 19-nor-5-androstènedione en méthanol 3,3 % v/v à pH 7,0 et à 25° C.

Paramètres cinétiques	5-androstènedione	19-nor-5-androstènedione
K_m s'exprime en moles/litre	$3,0 \times 10^{-4}$	$1,40 \times 10^{-4}$
k_{cat} est exprimé en moles de substrat transformé par mole d'enzyme et par minute	$14,7 \times 10^{-6}$	$5,1 \times 10^{-6}$

Les expériences ont été effectuées en tampon Tris(HCl) 0,03 M.

Equivalence des sites :

La méthode cinétique permet la détermination de l'affinité d'un stéroide inhibiteur compétitif. Nous l'avons également déterminé par la méthode d'équilibre de dialyse, l'affinité est voisine de celle trouvée par cinétique enzymatique compte tenu de la diminution de l'affinité par augmentation de la concentration en méthanol (voir tableau XII). Les mesures faites en l'absence de solvant organique, à pH 7,0 et à 4° C, avec l'oestradiol, ont donné un K_i de $1,0 \times 10^{-6}$ M, et le nombre des sites n est égal à 3,0 pour une concentration en isomérase de $1,8 \times 10^{-6}$ M.

La représentation de Johnson et Eyring (59) permet de savoir si ces différents sites sont équivalents au point de vue de l'affinité. En portant le log $\left(\frac{v_i}{v'_i} - 1\right)$ en fonction du log I (v_i et v'_i sont respectivement les vitesses initiales en l'absence et en présence de l'inhibiteur, I étant la concentration en inhibiteur), on obtient une droite de pente n. Si n est égal à 1, les sites sont équivalents. La figure 27 montre cette représentation en présence de Δ^5P et en dioxane 15 % v/v pour l'oestradiol, le 17α-oestradiol et le 17-acétate d'oestradiol. Avec ces trois inhibiteurs on obtient une pente voisine de 1.

pour le 17β-oestradiol	n = 0,94
17α-oestradiol	n = 1,06
17β-acétate-oestradiol	n = 1,08

Ce résultat est confirmé par l'équilibre de dialyse. La représentation de Scatchard (60) ne montre par d'interaction entre les sites.

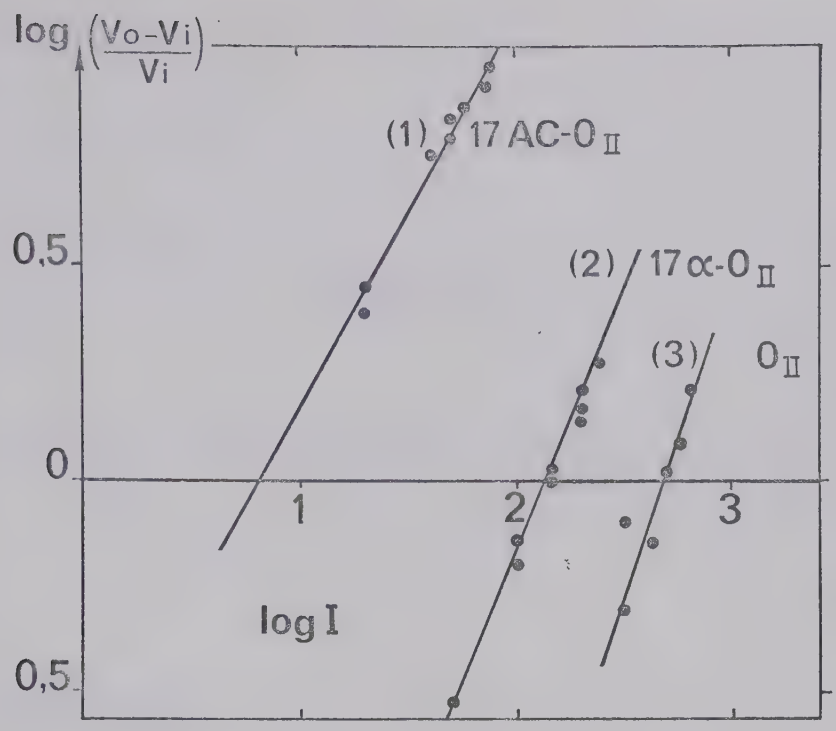


Figure 27

Représentation de Johnson et Eyring (59). Variation de log ($\frac{v_o - v_i}{v_i}$) en fonction de log I. v_o est la vitesse initiale en absence d'inhibiteur, v_i est la vitesse initiale en présence d'inhibiteur. I est la concentration en chaque inhibiteur.

Courbes : (1) 17-acétate d'oestradiol

(2) 17α-oestradiol

(3) oestradiol

Les expériences ont été effectuées à pH 7,0 et à 25° C. En présence de 5-prégnènedione comme substrat.

CHAPITRE II

GROUPES IMPLIQUES DANS L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

A - EFFET DU pH

Généralement l'activité catalytique des enzymes est restreinte à une zone de pH assez étroite. On définit ainsi un pH optimum d'activité. Cet optimum de pH peut résulter : d'une part, d'un effet du pH sur la stabilité de la protéine qui peut se dénaturer irréversiblement de part et d'autre de ce pH optimum ; d'autre part, d'un effet sur les constantes cinétiques apparentes K_m et V_m.

L'effet du pH sur les constantes cinétiques apparentes a été interprété d'après Dixon (61). Les effets observés sont considérés comme le résultat d'un changement dans l'état d'ionisation des différents composants du système : soit du substrat libre, soit de l'enzyme libre, soit du complexe intermédiaire.

Pour l'enzyme on admet la théorie de la catalyse bi-fonctionnelle (62). L'activité de l'enzyme est liée à deux groupes essentiels (1) et (2) du centre actif. La forme active correspond à l'une des formes ioniques de l'enzyme. La concentration d'un constituant A du système sous une forme ionique i, sera une fonction de sa concentration totale "A_t" et des constantes d'ionisation K de A, ainsi que de la concentration en protons du milieu. On définit ainsi des fonctions de Michaëlis f_A^i telles que :

$$A = \frac{A_t}{f_A^i}$$

- Effet du pH sur V_m

Les variations de V_m en fonction du pH seront uniquement liées à l'ionisation du complexe intermédiaire ES (qui est actif). Si $V_m^{opt.}$ est la vitesse maximum au pH optimum, la vitesse maximum V_m à un pH donné sera (61) :

$$V_m\ (pH) = \frac{V_m^{opt.}}{1 + \frac{(H^+)}{K_{es_1}} + \frac{K_{es_2}}{(H^+)}}$$

K_{es_1} et K_{es_2} sont des constantes d'ionisation du complexe ES.
En écrivant cette relation sous une forme logarithmique

on a :

$$\log V_m(pH) = \log V_m^{opt} - \log \left[1 + \frac{(H^+)}{K_{es_1}} + \frac{K_{es_2}}{(H^+)} \right]$$

Si l'on pose

$$1 + \frac{(H^+)}{K_{es_1}} + \frac{K_{es_2}}{(H^+)} = f_{es}^- \quad \text{et} \quad - \log f_{es}^- = pf_{es}^-$$

on a :

$$\log V_m\ (pH) = \log V_m^{opt} + pf_{es}^-$$

La représentation graphique de $\log V_m$ en fonction du pH permet la détermination de pK d'ionisation des groupes impliqués dans le complexe intermédiaire.

- Effet du pH sur K_m

Nous admettons que K_m est une constante d'équilibre. Les variations du K_m en fonction du pH dépendront alors à la fois de l'ionisation du substrat, de l'enzyme et du complexe intermédiaire. Si K_m^{opt} est la constante d'équilibre au pH opitmum (tous les constituants sont alors sous forme active), K_m est une fonction du pH :

$$K_m(pH) = K_m^{opt} \frac{f_e^- . f_s^-}{f_{es}^-}$$

En écrivant cette équation sous sa forme logarithmique on a :

$$pK_m(pH) = pK_m^{opt} - pKf_{es}^{-} + pKf_e^{-} + pKf_s^{-}$$

La représentation de log $1/K_m$ en fonction du pH permet la détermination des pK d'ionisation des groupes (1) et (2) de l'enzyme libre et du complexe intermédiaire (si le substrat ne s'ionise pas). Selon Dixon (61) :

(1) Cette représentation est constituée par des sections de droites (si les pK d'ionisation de groupes (1) et (2) sont suffisamment éloignés) reliées entre elles par des petites parties courbes.

(2) La pente de chaque section de droite est un nombre entier positif ou négatif : 0,1 ou 2, car ce nombre correspond au changement de charge dû au départ ou à la fixation d'un proton quand le complexe ES se dissocie en enzyme et en substrat libre.

(3) Chaque point anguleux correspond au pK d'ionisation de l'un des composants du système,et le pK est défini au point d'intersection de ces droites. La courbure se trouve en-dessous de ces points d'intersection à une distance de 0,3 unités, si l'ionisation d'un seul groupe intervient dans la zone de pH considérée.

(4) Lorsque le pK correspond à l'ionisation d'un groupe dans le complexe ES, on obtient une courbure dont la concavité est tournée vers le haut. Dans le cas de l'ionisation de l'enzyme et du substrat libre, cette concavité est tournée vers le bas.

D'après les valeurs de ces différents pK on peut identifier les groupes du centre actif impliqués dans les deux étapes de la réaction enzymatique.

B - EFFET DE LA TEMPERATURE

I - Détermination des paramètres thermodynamiques.

Les changements observés dans les vitesses des réactions enzymatiques en fonction de la température peuvent résulter de différents effets (61) :

- Effet de la température sur les constantes de vitesses k et les constantes d'équilibre K pour les différents constituants du système.
- Effet sur l'état d'ionisation des groupes indispensables à l'activité catalytique.
- Effet sur la stabilité de l'enzyme.
- Effet sur les propriétés physiques du solvant : pH, constante diélectrique, etc...

- Effet de la température sur les paramètres cinétiques K_m et V_m.

L'effet global de la température résulte d'effets séparés sur chacune des étapes réactionnelles; d'une part formation du complexe ES ou EI (a) et d'autre part énergie d'activation du complexe ES en ES^* et décomposition du complexe ES^* en produits de la réaction avec régénération de l'enzyme (b).

Les lois thermodynamiques définissent les grandeurs fondamentales impliquées dans les réactions chimiques en solution : la variation de l'énergie libre ΔG, de l'enthalpie ΔH et de l'entropie ΔS. On les applique aux réactions enzymatiques en solution. Ces grandeurs sont liées aux constantes d'équilibre K et aux constantes de vitesses k.

a - Détermination de ΔG^o, ΔH^o et de ΔS^o dans la formation du complexe.

En présence d'un substrat ou d'un inhibiteur compétitif

$$\Delta G^o = - 2,3\ RT \log K = \Delta H^o - T\Delta S^o$$

R est la constante de gaz parfaits égale à 1,986 cal/degré/mole.

T est la température absolue en degrés Kelvin égale à $t^oc + 273$.

ΔH^o s'obtient en étudiant les variations de K ou de K_i en fonction de la température selon l'équation d'Arrhénius :

$$\Delta H^o = - 2,303\ R \frac{d(\log K)}{d(1/T)}$$

Représentation graphique

En portant log K_m ou log K_i en fonction de 1/T, on obtient une droite de pente $-\frac{\Delta H^o}{2,3R^o}$. La variation d'entropie ΔS^o est égale à $\Delta H^o - \Delta G^o/T$.

b - Détermination de ΔG^* et ΔH^* dans la deuxième étape de la réaction.

Les énergies d'activation sont obtenues à partir de la théorie des vitesses absolues (63):d'après cette théorie la vitesse de toute réaction à une température T, dépend uniquement de la concentration d'un complexe activé ES , riche en énergie, qui est en équilibre avec un complexe constitué par des molécules inactives ES, tel que :

$ES \rightleftharpoons ES^*$, et $K^* = \frac{(ES^*)}{(ES)}$. K^* est la constante d'équilibre pour ces deux formes de molécules. La théorie des vitesses absolues donne une relation entre K^* et la constante spécifique de décomposition du complexe k_s:

$$k_s = \nu \frac{kT}{h} \times K^*$$

k est la constante de Boltzmann ($1,38.10^{-16}$ ergs)
h est la constante de Planck ($6,62.10^{-27}$ ergs/sec)
T est la température absolue.
La vitesse de décomposition est indépendante de la nature du complexe.

γ est le coefficient de transmission. Il est en général peu différent de 1 (mais dans certaines réactions de transfert de protons les coefficients de transmission peuvent être inférieurs à 1,0). Nous admettrons que γ est égal à 1.

$\frac{kT}{h}$ est une constante universelle. Elle a la dimension d'une vitesse égale à $6,25 \times 10^{12}$ à 25° C, à $6,05 \times 10^{12}$ à 15° C, et $6,45 \times 10^{12}$ à 37° C. Elle représente la vitesse de passage des molécules activées au sommet de la barrière d'énergie.

Les équations thermodynamiques peuvent s'appliquer à cet équilibre $(ES) \rightleftharpoons (ES^*)$

$$\Delta G^* = -2,3\ RT \log K^* = -2,3\ RT \log \frac{h}{kT} \times k_s = \Delta H^* - T\Delta S^*$$

mais k_s doit s'exprimer en unités absolues c'est-à-dire en sec^{-1}, ce qui implique l'utilisation d'une enzyme pure de poids moléculaire connu.

Détermination de l'enthalpie d'activation ΔH^*

$$k_s = \frac{kT}{h} \exp^{-\Delta G^*/RT} = \frac{kT}{h} \exp^{-\Delta H^*/RT} \cdot \exp^{\Delta S^*/R}$$

En prenant les logarithmes et en dérivant par rapport à 1/T on obtient

$$\frac{d \log k_s}{d(1/T)} = -\left(\frac{\Delta H^* + RT}{R}\right) = \frac{-E}{R}$$

E est l'énergie d'activation expérimentale.
$\Delta H^{\neq}$ est alors : E - RT/R, le facteur RT ($\simeq$ 600 à 25°C).

Représentation graphique

Il suffit de déterminer k_s à différentes températures et de porter le log k_s en fonction de 1/T. On obtient une droite, de pente $-\frac{E}{2,3\ R}$. Cette représentation peut s'appliquer même lorsque les vitesses sont exprimées en unités arbitraires, car ΔH^{*} est déterminée par la pente de la droite. ΔS^{*} s'obtient par différence.

II - Effet de la température sur l'état d'ionisation des groupes (1) et (2), impliqués dans l'activité enzymatique (61).

Le changement de la température entraîne dans certains cas un déplacement de pK d'ionisation des groupes (1) et (2). Ces déplacements de pK permettent alors la détermination de la chaleur d'ionisation ΔH_i de ces groupes, d'après l'équation de Vant'Hoff :

$$\Delta H_i = -\ 2,303\ RT^2\ \frac{d(pK)}{dT} = 2,303\ R\ \frac{d(pK)}{d(1/T)}$$

La connaissance de ΔH_i en cal/mole, permet l'identification des résidus d'amino-acides impliqués dans le processus enzymatique (64). Si l'on admet qu'il n'y a pas d'interférence entre les groupes impliqués ou que ces groupes sont enfouis dans la molécule protéique.

Lorsque le K_m ne varie pas avec la température, ce que l'on observe avec l'isomérase, et si on se place à une concentration en enzyme et à une concentration en substrat qui est grande par rapport au K_m, les vitesses initiales reflètent alors les vitesses maxima, au pH considéré.

Matériel et Méthodes

Cette étude a été effectuée en méthanol 3,3 % v/v. Les concentrations finales de la Δ^5A dans la cuve de mesure sont de 50 à 500 µM. On tient compte de l'isomérisation spontanée du substrat qui est importante dans la zone très alcaline, au-delà de pH 9,5, ainsi que de la Δ^4A présente au temps zéro (3 % environ), dont l'absorbance molaire en milieu aqueux est de 16.300 à 248 nm.

L'enzyme

Les solutions d'isomérase ont des concentrations finales de 4.10^{-12} M dans la zone de pH comprise entre 6,0 et 8,5 et de 10^{-11} M de pH 3,0 à pH 6,0 et au-delà de pH 8,5.

L'inactivation de l'enzyme est irréversible au-delà des pH extrêmes : 3,0 et 9,5 à 25° C après 4 heures d'incubation. Cependant cette inactivation est négligeable après 10 minutes (figure 28). Cette inactivation a été suivie entre pH 3,0 et 10,3 en différents tampons 0,03 M, NaCl 0,1 M à 4° C. L'enzyme a été préincubée pendant

10 minutes(courbe 28a) et pendant 4 heures (courbe 28b). Les vitesses initiales de la réaction ainsi obtenue ont été mesurées dans des conditions d'activité optimum : à pH 7, et à 24° C, en tampon phosphate de potassium 0,03 M. La concentration finale de la Δ^5A était de 58 µM, celle de l'isomérase de 2.10^{-12} M. La réversibilité a été vérifiée pour chaque pH.

Les tampons sont selon le pH :

pH 2,2 à 3,6 : glycocolle, acide chlorhydrique

pH 3,6 à 5,8 : acétate de sodium ou de potassium, acide acétique.

pH 5,8 à 8,0 : phosphate mono ou disodique ou dipotassique.

pH 7,2 à 9,2 : tris-(hydroxymethyl)-aminométhane, acide chlorhydrique (Tris ClH).

pH 9,6 à 10,6: glycocolle, soude.

Ni l'addition de méthanol (3,3 % v/v) ni l'isomérisation enzymatique n'affectent le pH (66).

Mesures cinétiques

Le milieu réactionnel de 3 ml de volume final contient 2,90 ml de tampon 0,03 M, 0,1 M en ClNa, 0,10 ml de méthanol soit 3,3 % v/v, et 10 à 50 µl de solution enzymatique. La cuve de référence contient tous les réactifs sauf la solution de stéroide que l'on remplace par un volume équivalent de méthanol.

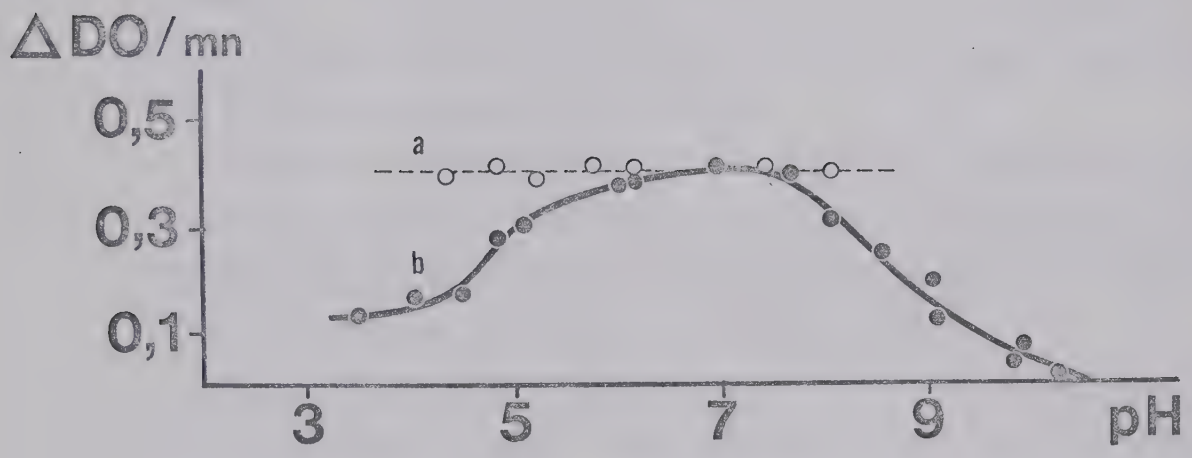


Figure 28

Inactivation de l'isomérase en fonction du pH.

a) L'isomérase a été préincubée 10 minutes en différents tampons 0,03 M et ClNa 0,1 M de pH 3,5 à 10,3.

b) L'isomérase a été préincubée 4 heures dans les mêmes conditions. Les conditions expérimentales sont définies dans le texte.

RESULTATS

1) Effet du pH sur les constantes cinétiques apparentes

L'étude cinétique de l'isomérisation de la 5-androstènedione a été effectuée à 21°5 C $\pm$ 0,05 dans des solutions tamponnées 0,03 M de pH 3 à 10, contenant du ClNa 0,1 M et du méthanol 3,3 % v/v.

V_m est exprimée en moles de substrat transformées par unité d'enzyme/ml. Les résultats sont rapportés sur les figures 29 et 30 (représentation de Lineweaver et Burk (55) $1/v_i$ en fonction de 1/S à différents pH).

K_m et V_m varient en fonction du pH. Cependant entre pH 6,0 et 9,0 le K_m est pratiquement constant, de l'ordre de $3,2 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M. Dans les mêmes conditions V_m est de l'ordre de 100. On est limité par l'insolubilité du substrat aux fortes concentrations et par la sensibilité des mesures spectrophotométriques aux faibles concentrations.

L'effet du pH sur les paramètres cinétiques apparents a été interprété d'après Dixon (61) ; en termes de pK de l'enzyme libre pK_e, des complexes enzyme-substrat pK_{es} et du substrat libre pK_s. En l'absence d'une étude des cinétiques rapides, le schéma réactionnel peut être représenté par l'équation (1) de Michaëlis. On ne tient pas compte de l'effet du solvant.

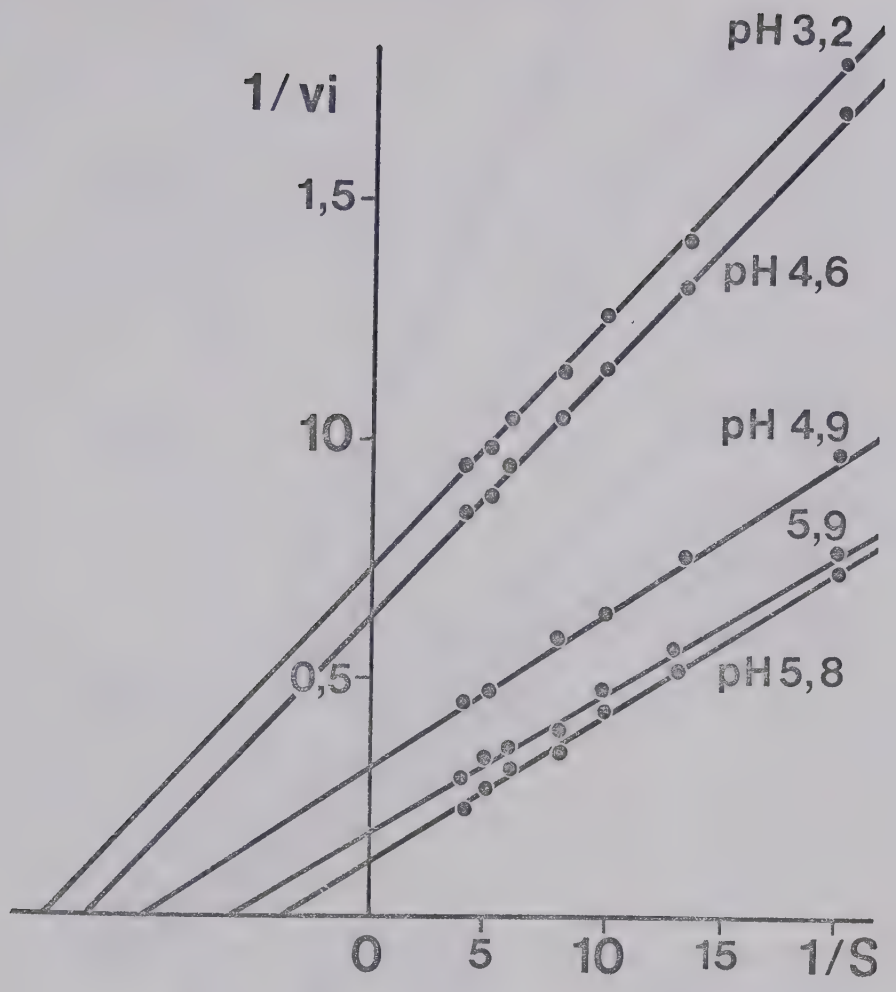


Figure 29

Influence du pH (entre pH 3,2 et 5,8) sur la vitesse d'isomérisation de la 5-androstènedione. Représentation de Lineweaver et Burk. Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte.

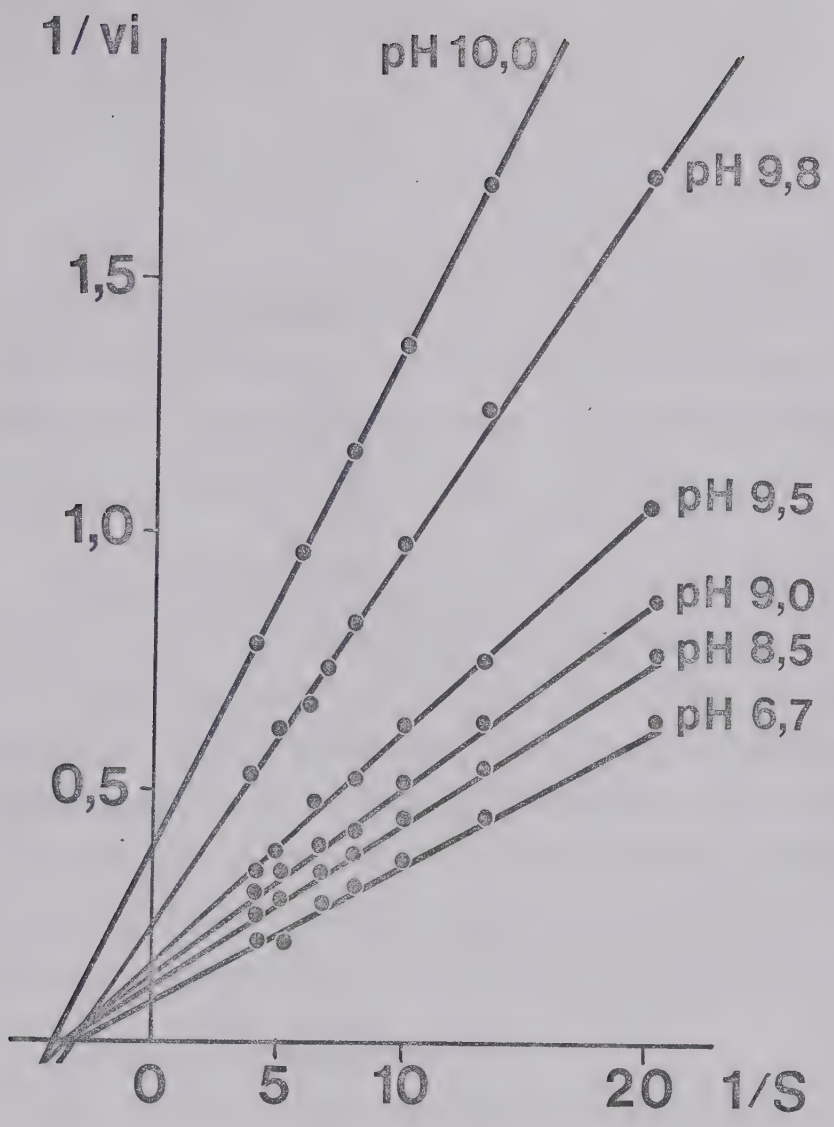


Figure 30

Influence du pH (entre pH 6,7 et 10), sur la vitesse d'isomérisation de la 5-androstènedione. Représentation de Lineweaver et Burk. Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte.

La représentation de log V_m en fonction du pH est donnée par la figure 31 et montre un optimum d'activité assez large entre pH 6 et pH 9. Elle permet de mettre en évidence 2 pK_{es} d'ionisation du complexe enzyme-substrat :

$pK_{es} = 5,60$ et $pK_{es} = 9,30$

La figure 32 donne la variation du pK_m en fonction du pH. On observe 2 points d'inflexion de pH 4,70 et 5,60.

En accord avec la théorie de Dixon, le pK 4,70 peut être attribué à l'enzyme libre (car le substrat ne s'ionise pas) et celui de 5,60 à l'ionisation d'un groupe du complexe enzyme-substrat. On remarque que le même pK_{es} de 5,60 apparait à la fois dans la formation du complexe ES et dans sa décomposition en enzyme et produit de la réaction.

2) Etudes thermodynamiques

a) L'effet de la température sur les pK_{es} d'ionisation

L'étude a été effectuée entre 15°4 et 38°4 C. Le K_m ne varie pas dans cette zone de température. La figure 33 montre les variations de log des vitesses initiales v_i en fonction du pH à 3 températures. L'équation de Vant'Hoff permet de relier ces variations de pK_{es} apparents à la chaleur d'ionisation ΔH_i du groupe impliqué dans l'activité enzymatique (64).

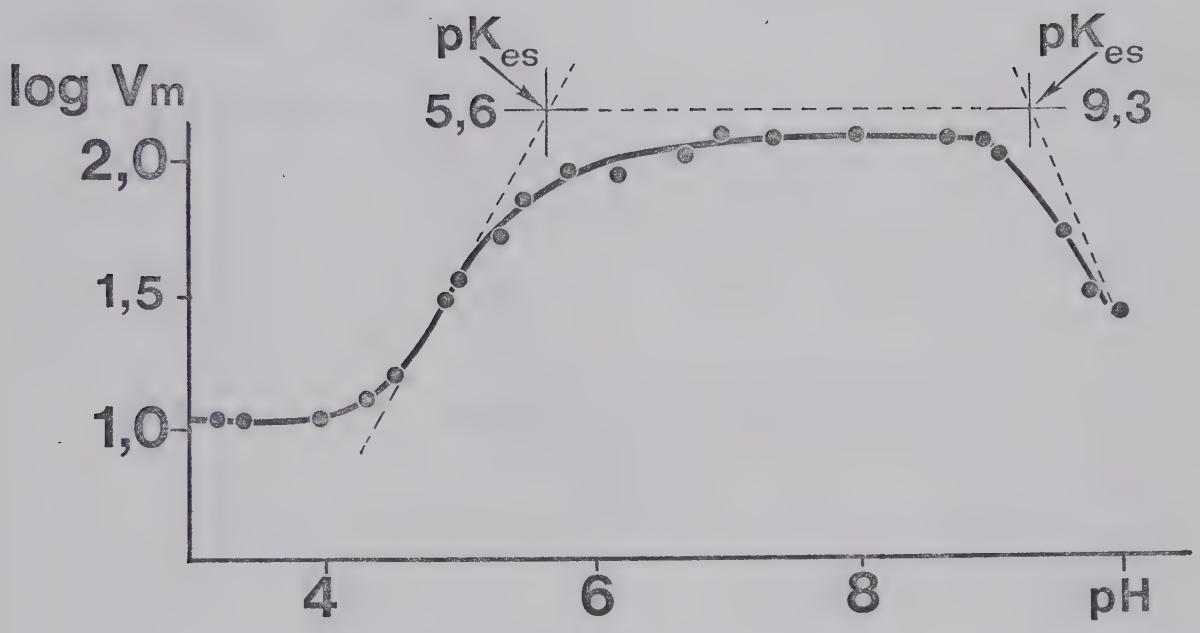


Figure 31

Effet du pH sur log Vm de l'isomérisation de la 5-androstènedione en 4-androstènedione par l'isomérase. Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte.

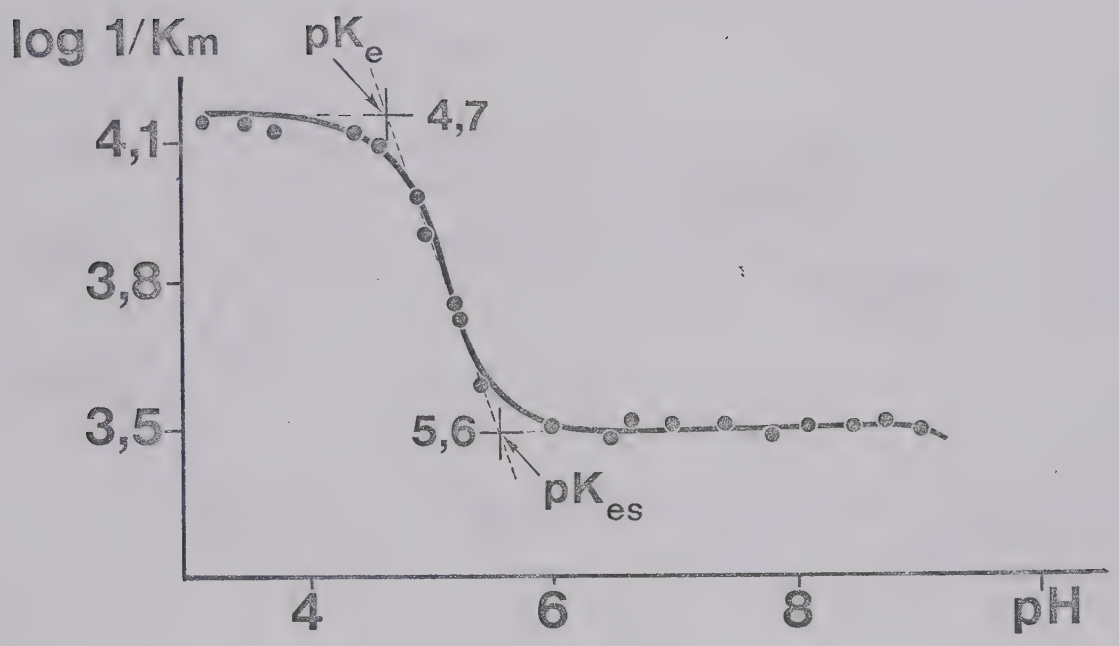


Figure 32

Effet du pH sur log $1/K_m$ de l'isomérisation de la 5-androstènedione par l'isomérase.

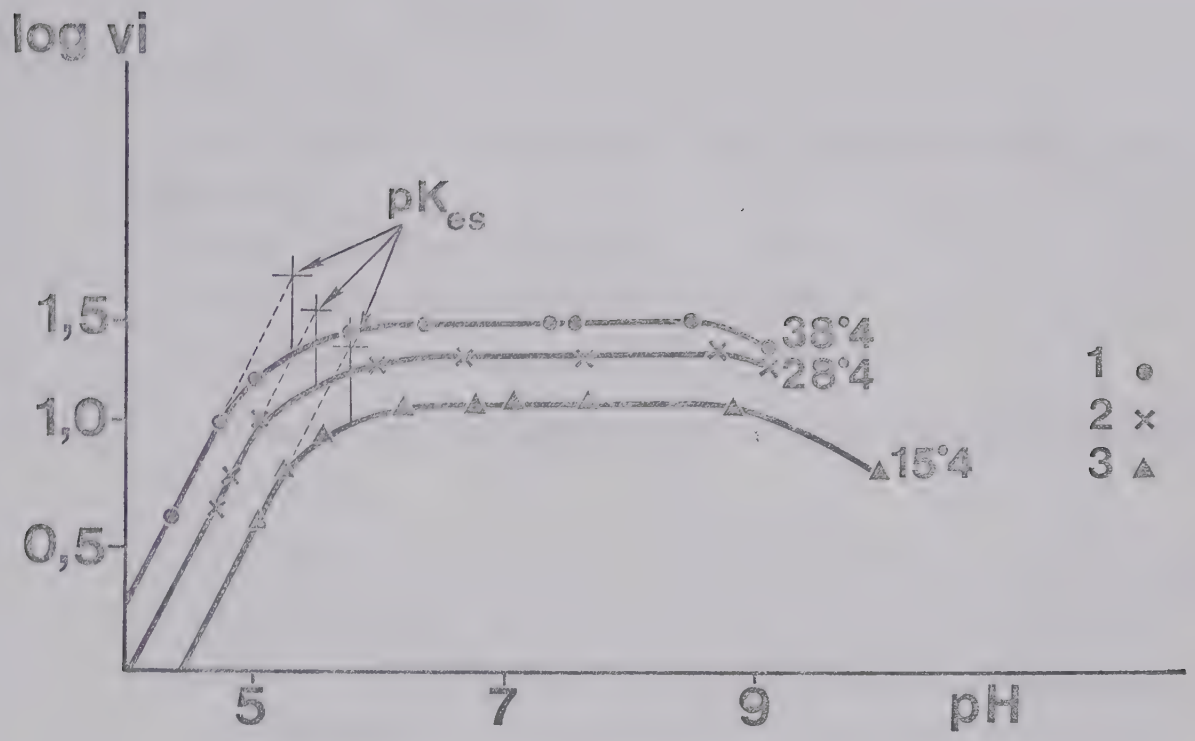


Figure 33

Effet de la température sur log v_i de l'isomérisation de la 5-androstènedione en fonction du pH à 3 températures :

(1) 38°4 C

(2) 28°4 C

(3) 15°4 C

Conditions d'expérience : tampons 0,03 M, ClNa 0,1 M. Substrat : 5-androstènedione 5×10^{-4} M, enzyme isomérase: $1,23 \times 10^{-2}$ unités/ml (le K_m est dans ces conditions égal à 3×10^{-4} M).

Les pK_{es} d'ionisation des courbes sont à 15°4 : 5,76, à 28° 4 : 5,50 et à 38°4 : 5,30.

Les chaleurs d'ionisation ΔH_i correspondantes sont alors de :

7200 cal/mole entre 28°4 et 38°4 C

8200 cal/mole entre 15°4 et 38°4 C

8000 cal/mole entre 15°4 et 28°4 C

b) Effet de la température sur les constantes cinétiques K_m et V_m.

Une étude en fonction de la température sur les constantes cinétiques K_m et V_m permet de calculer quelques constantes thermodynamiques de la réaction enzymatique.

La représentation de log V_m en fonction de 1/T à pH 7,40 est donnée par la figure 34. Des mesures à pH 7,90 et 8,05 ont donné des variations identiques, confirmant l'existence d'une large zone d'optimum d'activité.

(a) Formation du complexe ES

$K_m = 3,2 \times 10^{-4}$ M à 25° C et pH 7,40.

k_1, k_2 et k_3 sont des constantes de vitesses respectivement de la formation du complexe ES, de sa dissociation inverse et de la décomposition du complexe activé.

Si $K_m = k_2/k_1$ et si $k_S \ll k_2$

$\Delta G^o = - 2,3\ RT \log K_m$

$\Delta G^o_{K_m} = -4750$ cal/mole

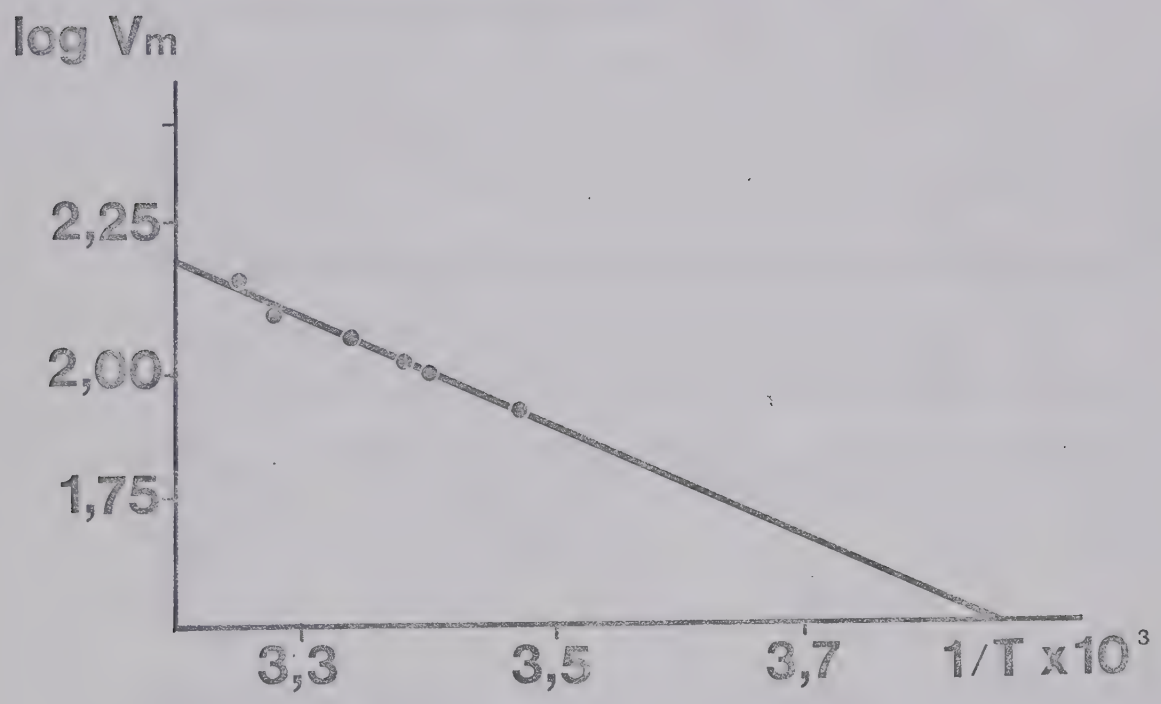


Figure 34

Effet de la température sur log Vm de l'isomérisation de la 5-androstène à pH 7,4, en tampon Tris HCl 0,03 M et ClNa 0,1 M. K_m est dans ces conditions égal à $3,2 \times 10^{-4} \pm 0,2$ M.

$\Delta H^{o}_{K_m}$ = 0 cal/mole. Nous avons admis que $\Delta H^{o}_{K_m}$ pour le K_m était nul, puisque le K_m ne varie pas d'une manière significative avec la température dans les limites de l'erreur. $\Delta S^{o}_{K_m}$ = + 15,8 u.e. La variation de l'enthalpie de formation du complexe ES est nulle, par contre, la variation de l'entropie ΔS^{o} est positive pour la formation du complexe.

(b) Formation du complexe activé ES^{*} et décomposition.

$k_{3(a)} = 2{,}86.10^{5}.sec^{-1}$ (calculé par Talalay) (1)
$k_{3(b)} = 2{,}45.10^{5}.sec^{-1}$ (obtenu expérimentalement)
$\Delta G^{*}_{V_m(a)}$ = 9.995 cal/mole ; $\Delta G^{*}_{V_m(b)}$ = 1.100 cal/mole
$\Delta G^{*}_{V_m}(b)$ = 4.600 cal/mole ;
$\Delta S^{*}_{V_m(a)}$ = - 18 u.e., $\Delta S^{*}_{V_m(b)}$ = - 18 u.e.

Toutes ces valeurs (b) sont calculées à partir des expériences effectuées en 3,3 % de méthanol (tableau XI, p. 119). L'enthalpie d'activation est remarquablement faible.

Discussion

Les résultats apportés dans ce travail démontrent qu'un ou plusieurs groupes de l'enzyme, dont le pK d'ionisation est compris entre pH 5,0 et 6,0 sont impliqués dans le transfert des protons. L'ionisation du substrat peut être éliminée puisqu'on sait que le stéroide ne s'ionise pas dans cette zone de pH.

La chaleur d'ionisation de 7.800 cal/mole pourrait correspondre à celle d'un radical imidazole d'une histidine impliqué dans le complexe enzyme-substrat (66). Compte tenu cependant de l'imprécision des mesures thermodynamiques,

il est impossible de l'affirmer. Cependant on ne peut éliminer la contribution d'autres groupes dont les chaleurs d'ionisation ΔH_i seraient voisines. En plus si l'on admet la proximité de groupes qui s'ionisent avec un ΔH_i très élevé, le ΔH_i que l'on détermine est élors égal à la moyenne des différents ΔH_i et dans ce cas on ne peut éliminer l'ionisation d'un carboxyle dont le ΔH_i se situe entre - 2000 et + 2 000 cal/mole. Cependant on n'a pas constaté de variation du pK d'ionisation au cours d'expériences effectuées en présence de 13,3 % v/v de méthanol afin d'abaisser la constante diélectrique (67). De plus, la photo-oxydation par le bleu de méthylène inactive l'enzyme (68). Ces dernières observations seraient en faveur de l'ionisation d'un groupe imidazole.

Selon Malhotra et Ringold (3), on peut supposer que le mécanisme d'isomérisation des $\Delta^{5(6)}$ et $\Delta^{5(10)}$ oxostéroides par l'enzyme bactérien implique une étape d'énolisation du carbonyl en C3 du substrat. Le donneur de proton serait un groupe électrophile AH^+ de l'enzyme. L'énolisation serait suivie de la perte du proton $C_4\beta$ et cette attaque nucléophile se ferait par un groupe B de l'enzyme. Puis, dans une étape rapide, il y aurait reprotonation en $C_6\beta$ par BH^+. La perte du proton du carbonyl 3, repris par le groupe A de l'enzyme, donnerait le produit de la réaction (Δ^4 3-oxostéroide) et l'enzyme régénéré. On peut en fait supposer la participation simultanée d'un carboxyle et d'un imidazole de l'enzyme comme dans le cas

de la trans-glutaminase (69) et le modèle décrit par Wang (70) de transfert de protons le long d'une chaîne rigide des liaisons hydrogènes pourrait donc s'appliquer au cas de l'isomérase.

L'ionisation de l'enzyme libre à pH 4,7 pourrait être due à un groupe imidazole qui par suite de son environnement, s'ioniserait à un pH différent quand il est impliqué dans le complexe enzyme-substrat. Mais il pourrait également s'agir d'un groupe carboxyle terminal appartenant à l'alanine ou à un résidu dicarboxylique.

L'ionisation de pK 9,30 que l'on observe sur la courbe log V_m en fonction du pH, fait penser qu'il pourrait s'agir d'une tyrosine ou d'une lysine ou d'une méthionine terminale. Des déterminations des chaleurs d'ionisation sont encore nécessaires pour pouvoir les distinguer. Cependant Talalay (3) a montré par des études de fluorescence avec des inhibiteurs compétitifs (oestradiol et 19-nortestostérone) que la fluorescence est éteinte lors de la formation de ces complexes E-I (enzyme-inhibiteur) et que cette extinction est due au blocage des tyrosines impliquées dans la formation de E-I. Des études de fluorescence en fonction de la température, en présence et en l'absence de ligand (inhibiteurs compétitifs) confirment ces résultats. En effet, l'isomérase est protégée contre la dénaturation thermique par le ligand. L'intensité de fluorescence des

tyrosines de l'isomérase dont le pic d'émission se situe vers 315 nm est très sensible aux variations de la température en absence de ligands analogues de substrat. Par addition d'inhibiteurs compétitifs (19-nor-testostérone et oestradiol) cette sensibilité des tyrosines aux variations de la température est moindre (71).

Deux groupes au moins semblent donc impliqués dans le transfert des protons catalysés par l'isomérase.

Enfin on observe une faible variation d'enthalpie d'activation (4.600 cal/mole), alors que dans la catalyse basique elle est ΔH^* = 12.000 cal/mole et dans la catalyse acide ΔH^* = 14.600 cal/mole (72). D'autre part on observe un effet entropique défavorable.

CHAPITRE III

INTERACTIONS TERNAIRES, STEROIDE-PROTEINE-SOLVANTS.

Dans la partie cinétique enzymatique nous avons étudié l'influence de la structure des stéroides substrats ou analogues de substrats sur la réaction d'isomérisation. Nous n'avons pas tenu compte du milieu solvant. Or l'eau est l'environnement unique de toute réaction biologique. Tout soluté qui modifiera la structure de l'eau aura de ce fait une influence sur la catalyse enzymatique. En particulier les molécules de stéroides sont fortement hydrophobes, car elles sont constituées par des cycles rigides avec peu de groupes polaires. Il est probable que de ce fait, l'interaction protéine-stéroide sera régie en partie par des interactions hydrophobes. En effet, ces cycles hydrocarbonés ne formeront que très peu de liaisons hydrogène avec l'eau ; par contre ces cycles auront tendance à s'associer en détruisant la structure plus ordonnée de l'eau de solvatation entourant ces molécules isolées, entraînant une variation d'entropie positive et une diminution de l'énergie libre. Cette tendance des groupes apolaires d'éviter le milieu aqueux et de s'associer est appelée "interaction hydrophobe" (73). De plus,la faible

solubilité des stéroides dans l'eau rend l'emploi des solvants organiques indispensable. Or, ces solvants organiques modifieront à leur tour la structure de l'eau. Nous envisagerons donc un système ternaire : protéine, stéroide et milieu aqueux. Pour étudier l'existence et l'importance de ces interactions hydrophobes nous avons modifié, soit la nature du stéroide (plus ou moins polaire), soit la polarité du milieu en faisant varier sa concentration en solvant organique (74,75). Dans ces conditions nous avons mesuré les coefficients de partage des stéroides entre deux phases. Nous avons aussi effectué des mesures thermodynamiques qui rendent compte des variations énergétiques liées aux modifications du milieu aqueux. On peut en effet écrire pour la vitesse d'isomérisation (76) :

$$v_i = k_s \, (ES)$$

$$(ES) = (E) \, (S) \, \frac{k_1}{k_2}$$

(termes déjà définis dans le premier chapitre).

Il s'ensuit que (76) :

$$\log v_i = \log k_s + \log \frac{k_1}{k_2} + \log (E) + \log (S) \qquad (3)$$

(E) et (S) peuvent être considérés comme des constantes au moment initial de la réaction enzymatique.

L'équation empirique de Hammett (77,78) propose une relation quantitative générale entre la nature d'un substituant "R" sur un dérivé benzénique et les constantes d'équilibre ou de vitesse d'une réaction produite sur différentes chaînes latérales de ce dérivé. Cette équation de Hammett s'écrit : $\log K = \rho\sigma$, où k est une constante d'équilibre ou de vitesse, ρ est une constante qui dépend du type de la réaction, σ est une constante qui dépend uniquement de la position et de la nature du substituant. On voit donc que log K est proportionnel, soit à la différence des énergies libres de la réaction correspondant au dérivé substitué et non substitué, si k est une constante d'équilibre, soit à la différence des énergies d'activation, si K est une constante de vitesse. Hammett a discuté cette relation linéaire et a suggéré que la variation des énergies libres, ou des énergies d'activation, peut être considérée comme la somme de trois termes : variation d'entropie, variation d'énergie cinétique et variation d'énergie potentielle.

L'équation (3), dans laquelle $\frac{k_1}{k_2}$ a été assimilé à une constante d'équilibre, peut être écrite sous la forme :

$$\log v_i = k\pi + \rho\sigma + C \qquad (4)$$

En effet, si l'on suppose que le partage du stéroïde (approché expérimentalement par le coefficient de partage "K_p" que nous définirons plus loin), entre la phase aqueuse et la

phase hydrophobe, constituée par le site hydrophobe de l'enzyme, est défini par le terme log $1/K_m$ ($\frac{k1}{k2}$). On montre que log $1/K_m$ est une fonction linéaire de log K_p ou (π). Le terme $k\pi$ décrit ainsi la première étape de la réaction : la formation du complexe E-S ou E-I. Dans cette première étape, l'expression $\rho\sigma$, fonction linéaire de log k_s ne semble pas jouer un rôle important. Les modifications de k_s reflètent les modifications de $\rho\sigma$ et décrivent la deuxième étape de la réaction : le transfert de proton. La constante ρ de l'équation de Hammett, est directement reliée aux interactions soluté-solvent comme l'a montré Hepler (85), en définissant une "contribution de l'environnement". Nous avons étudié cette contribution, sur la deuxième étape de la réaction en modifiant le milieu solvant par addition des différents solvants organiques.

A - ETUDE DU PARTAGE

Définition du coefficient de partage "K_p".

Le coefficient de partage "K_p" est une constante d'équilibre. K_p est égal aux rapports des activités à l'équilibre d'un soluté S_x(le stéroide) entre deux phases non miscibles P_1 et P_2. Dans ce travail nous

confondrons les activités et les concentrations, dans ces conditions K_p est donné par la relation (79) :

$$Kp = R \frac{C_i - C_e}{C_e}$$

C_i est la concentration initiale (au temps "t" zéro) de S_x dissout dans la phase P_1.
C_e est la concentration de S_x dans la phase P_1 (au temps "t" après établissement de l'équilibre).
R est le rapport des volumes de P_1 et P_2.

Dans un partage idéal, Kp est indépendant de la concentration de S_x. Collander (80, 81) a pu montrer avec une série de molécules organiques que leur vitesse de déplacement à travers les tissus cellulaires de plantes était une fonction linéaire du logarithme du Kp de ces molécules entre deux phases non miscibles, constituées soit par l'éther et l'eau, soit par l'octanol-1 et l'eau. Hansch et coll. (76,82,83,84) étudiant des médicaments hypnotiques ont également montré par des mesures de Kp entre deux phases: (éther-eau ou octanol-1-eau), une relation entre l'efficacité du médicament et l'accroissement du caractère hydrophobe de la molécule. La variation du coefficient de partage permet donc d'étudier la variation de l'énergie libre de transfert d'un soluté S_x d'une phase P_1 à une

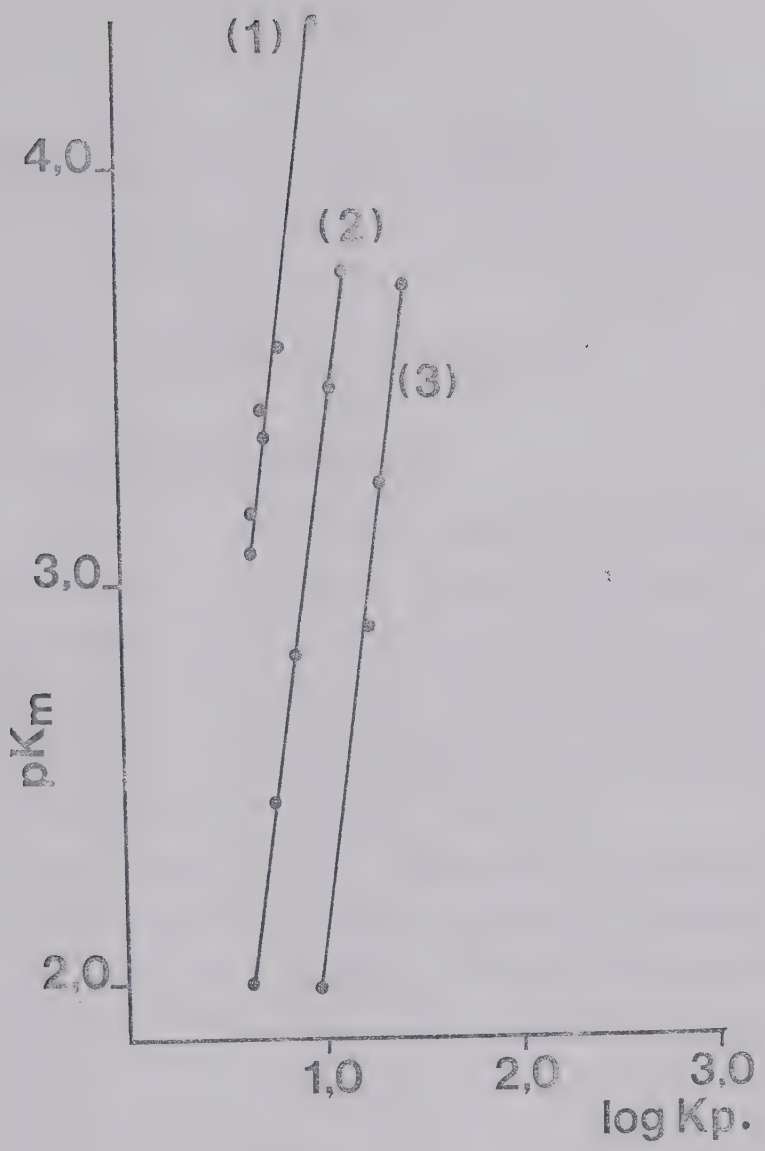


Figure 35

Variation du pK_m (log $1/K_m$) en fonction de log K_p (K_p est le coefficient de partage du stéroide entre l'iso-octane et la phase aqueuse contenant des concentrations croissantes de solvant organique)

Courbes (1) méthanol et 4-androstènedione

(2) éthanol et 4-androstènedione

(3) dioxane et 4-prégnènedione

phase P_2, puisque selon l'équation classique on peut écrire :

$$\Delta G = - 2,3 \, RT \log K$$

K étant une constante d'équilibre.

Matériel et Méthodes

Dans un tube cylindrique muni d'un robinet, on verse le liquide de la phase P_1, constitué par le tampon phosphate de potassium 0,03 M, pH 7,0 et différents solvants organiques en concentrations croissantes : méthanol, éthanol, les isomères du propanol et du butanol et le dioxane. Le stéroide est dissout dans P_1.

On superpose les liquides de la phase P_1 et P_2, puis on laisse sous agitation pendant 8 heures à 25° C. On sépare les deux phases. On mesure la concentration du stéroide dans l'une des deux phases. La concentration en stéroide est déterminée soit par la mesure de l'absorbance à 248 nm, soit par la mesure de la radioactivité, avant et après l'établissement de l'équilibre. Le temps nécessaire pour l'obtention de l'équilibre est de six heures. Nous avons adopté une valeur de R = 30, 30 ml de volume total (tampon plus alcool ou dioxane), pour comparer ces résultats avec ceux obtenus par cinétiques enzymatiques dont les mesures ont été effectuées dans un volume total de 3 ml, donc correspondant à un volume dix fois plus petit.

La phase organique, l'isooctane est d'1 ml. Les coefficients de partage Kp des différents stéroides ont été déterminés avec les Δ^4-3-oxo-stéroides, qui correspondent aux produits de la réaction, non aux substrats de l'isomérase. L'isomérisation partielle spontanée des Δ^5-3-oxostéroides pendant le temps nécessaire à l'établissement de l'équilibre n'a pas permis leur utilisation. Il existe cependant une différence de solubilité entre les Δ^4 et les Δ^5-3-oxostéroides, mais leur Kp varie dans le même sens par changement de la polarité du milieu. Ces changements de polarité s'obtiennent par addition de solvants organiques à différentes concentrations. Il faut remarquer que les Kp sont apparents, car le système comprend probablement plus de deux phases extrêmes. En effet une phase supplémentaire pourrait être formée par la dissolution de l'alcool dans l'isooctane. Cependant nous avons utilisé l'isooctane au lieu de l'octanol utilisé par Fujita (82) pour éliminer cette phase supplémentaire. Nous la négligerons donc dans l'étude présente.

Nous sommes essentiellement intéressés par les variations relatives de Kp apparents en fonction de K_m apparents.

Résultats expérimentaux

La figure 35 montre l'existence d'une relation linéaire entre le log Kp et le pK_m pour la Δ^5A, la 19 nor-Δ^5A et

la $\Delta^5 P$, ceci pour différents solvants organiques, en concentrations croissantes dans la phase P_1 (méthanol, éthanol et dioxane).

La pente de ces droites "a" est égale à 3,0 $\pm$ 0,2, elle est indépendante de la nature du solvant et de la structure du stéroide. Cependant, pour le même solvant, l'ordonnée à l'origine " b " dépend de la structure du stéroide, b décroît quand la polarité du stéroide décroît, b diffère d'un solvant à l'autre.

Cette relation linéaire observée peut être formulée quantitativement par l'équation suivante

$$\log 1/K_m = a \log Kp + b \qquad (5)$$

D'autre part, la variation de l'énergie libre standard ΔG_m^o pour la formation du complexe E-S peut s'écrire

$$\Delta G_m^o = - 2,3\ RT \log 1/K_m \qquad (6)$$

En multipliant par - 2,3 RT les deux membres de l'équation (5) on a :

$$- 2,3\ RT \log 1/K_m = - 2,3\ RT\ (3 \log Kp + b)$$

soit $\Delta G_m^o = 3\ \Delta G_p^o - 2,3\ RT\, b$

ΔG_p est l'énergie libre de transfert pour le stéroide. Pour des conditions de solvant et de soluté bien définies, le terme -2,3 RTb est une constante C. On peut alors écrire :

$$\Delta G_m^o = 3\ \Delta G_p^o + C$$

Nous avons émis l'hypothèse que l'interaction stéroide-protéine était analogue à un partage. La variation de l'énergie libre de liaison "ΔG_m^o" proviendrait essentiellement de la variation de l'énergie libre de transfert du stéroide "ΔG_p^o" de la phase polaire (tampon plus solvant) vers une phase apolaire constituée par la zone apolaire de l'enzyme. Or, d'après les calculs précédents, nous voyons qu'un tiers seulement de cette variation d'énergie d'interaction pourrait provenir de la variation de l'énergie libre de transfert. Il faut donc admettre une étape énergétique supplémentaire dans l'interaction protéine-stéroide, étape dont la variation d'énergie pourrait provenir d'une origine entropique. En effet comme nous l'avons vu (chapitre II), la formation du complexe ES s'accompagne d'une variation positive de l'entropie. Cette augmentation de ΔS pourrait provenir d'une part, de la destruction de la couche d'eau de solvatation autour du stéroide (ΔS_1) quand il se lie à une zone hydrophobe de l'enzyme, d'autre part, d'une transconformation locale de la protéine au cours de cette interaction (ΔS_2).

B - <u>IMPLICATION DU SOLVANT AQUEUX DANS LA REACTION D'ISOMERISATION</u>.

La relation linéaire entre le $\log \frac{k_1}{k_2}$ et le $\log K_p$ que nous avons démontrée par l'étude du partage, permet

de relier le paramètre $k\pi$ de l'équation (4) à la première étape de la réaction, dans laquelle l'expression $\rho\sigma$ a été négligée.

En admettant que le transfert de proton régi par le paramètre k_S (étape limitante) est relié linéairement aux termes $\rho\sigma$ de l'équation de Hammett (85,78), $\rho\sigma$ représentent une variation d'énergie libre (86) et on peut écrire :

$$\log k_3 = \rho\sigma$$

Hepler et coll. (85) ont démontré l'existence d'une telle relation linéaire de la variation de l'énergie libre pour l'ionisation des acides organiques et pour des réactions de transfert des protons dans l'eau.

Les variations des paramètres thermodynamiques de telles réactions ne peuvent s'interpréter qu'en supposant une variation des propriétés de l'eau liquide,ainsi que des interactions, soluté-solvant.Nous avons effectué des études thermodynamiques de l'isomérisation des stéroides,en ajoutant des cosolvants au milieu aqueux réactionnel pour mettre en évidence indirectement ces interactions soluté-solvant et la participation de la structure de l'eau dans cette réaction enzymatique.Dans les conceptions les plus récentes sur la structure de l'eau, deux modèles s'opposent "le modèle continu" (87) et "le modèle des mélanges", modèle à deux états en équilibre (88). Dans le modèle continu, basé

essentiellement sur des études spectroscopiques, toutes les molécules d'eau liquide sont liées par des liaisons hydrogène , mais toutes les liaisons ne sont pas équivalentes, n'ont pas la même énergie de liaison (torsion plus ou moins importante); il en résulte une différence de l'environnement local de ces molécules d'eau. Cependant les données thermodynamiques résultant de l'effet des solutés (89) sur la structure de l'eau liquide s'opposent au modèle de l'eau comme système continu.

Pour le modèle des mélanges,on envisage pour la structure de l'eau liquide deux formes extrêmes (90,91, 92, 93,94). L'une étant l'eau liée par des liaisons hydrogène (phénomène coopératif) formant des ensembles ouverts tétrahédriques "ice like", de durée de vie de 10^{-11} sec, et l'autre étant de l'eau dense non liée. Cet équilibre est dynamique, car ces ensembles se font et se défont continuellement , on les appelle des "essaims fluctuants" (95,96,97,98). Tout composé qui réduit la durée de vie de l'eau liée est appelé "destructeur de structure" (électrolytes, urée, chlorure de guanidine). Tout composé qui tend à prolonger cette durée de vie est appelé "promoteur de structure" (espèces non polaires, alcools monohydriques, stéroides), son passage dans l'eau s'accompagne d'une diminution d'entropie, et correspond au

déplacement de l'équilibre vers l'eau plus ordonnée, dont le degré de liberté des mouvements est réduit. Dans le travail qui suivra, nous admettrons pour la structure de l'eau "le modèle des mélanges". Le phénomène de compensation dont nous allons parler plus loin, est également une preuve indirecte du changement de l'équilibre, eau liée non liée.

Phénomène de compensation

Dans une revue générale Lumry et Rajender (99) montrent l'existence d'une relation linéaire entre la variation d'enthalpie (ΔH) et la variation d'entropie (ΔS) pour un grand nombre de réactions enzymatiques ou non enzymatiques lorsque l'on fait varier le milieu solvant; processus d'équilibre ou de vitesse de réaction. Cette relation linéaire montre le phénomène de compensation (100,101) : ΔH et ΔS se compensent pour produire de faibles variations d'énergie libre, ΔG est voisin de zéro. D'après Doherty et Vaslow (102,103), le phénomène de compensation résulterait de la faible variation de la chaleur spécifique des réactions considérées. Les droites ainsi obtenues sont appelées droites de compensation. La valeur de la constante de proportionnalité, donnée par la pente de ces droites, est appelée température isocinétique ou température de compensation "T_c" (99,104). T_c a la dimension d'une température absolue et se situe en général entre 250 et 320° K.

Selon Lumry (99), un déplacement de l'équilibre entre les deux espèces d'eau liquide (eau liée $\rightleftharpoons$ eau monomérique) serait responsable de ce phénomène, l'eau jouant un rôle comme solvant et non comme réactant chimique.

Likhtenstein a montré l'existence du phénomène de compensation pour la dénaturation thermique réversible pour quatre protéines (105). Cependant, ces expériences ayant été faites dans une zone de température proche du point de transition thermique "T_R" où ΔG était nécessairement nulle, la compensation qui en résultait entre ΔH et ΔS était accidentelle et non réelle. Cependant cet auteur (106,107,108) a montré un phénomène de compensation réel dans les réactions enzymatiques. Il a supposé un mécanisme énergétique en chaîne, c'est-à-dire que ΔG libéré dans un cycle enzymatique ("turn-over") était stockée dans l'eau de la couche de solvatation à la surface protéique, pour être réutilisée dans le cycle catalytique suivant. L'eau serait ici un système d'échange d'énergie.

Cependant si peu de preuves existent pour ce mécanisme en chaîne, néanmoins le phénomène de compensation qu'il observe est réel.

Doherty et Vaslow (102,103) ont proposé un modèle de compensation pour la fixation d'un inhibiteur sur l'α-chymotrypsine. Les changements des paramètres thermodynamiques que l'on obtient indiqueraient un repliement spontané de la protéine (qui était initialement dépliée), au

voisinage de l'inhibiteur ou du substrat produisant ainsi une augmentation de la réactivité du substrat par suite d'une distorsion et d'un changement local de son environnement (constante diélectrique ε). Le phénomène de compensation peut être une propriété spécifique de la protéine, mais il peut s'appliquer à la fois pour un mélange protéine, solvant et petites molécules de soluté.

D'après certains auteurs (108 à 112) toute réaction chimique (dissociation d'un acide par exemple), enzymatique ou non, peut être décomposée en deux processus :

a - Le processus chimique qui rend compte des réarrangements des électrons d'une molécule pour donner une paire d'ions dans le cas de la dissociation d'un acide . Dans l'isomérisation d'un stéroide ceci pourrait correspondre au réarrangement électronique entraînant le transfert de proton. On le nomme processus de Hammett défini par $\rho\sigma$, auquel correspond une variation d'énergie libre ΔG^{o}_{chim}.

b - Le processus de solvatation, auquel correspond une variation d'énergie libre ΔG^{o}_{solv}. La variation totale de l'énergie libre de la réaction est donnée par ΔG^{o} telle que :

$$\Delta G^{o} = \Delta G^{o}_{chim} + \Delta G^{o}_{solv} = \Delta H^{o} - T\Delta S^{o}$$

$$\Delta H^{o} = \Delta H^{o}_{chim} + \Delta H^{o}_{solv}$$

$$\Delta S^{o} = \Delta S^{o}_{chim} + \Delta S^{o}_{solv}$$

On admet que le phénomène de compensation est impliqué seulement dans la partie de solvatation. La variation de l'enthalpie de solvatation étant représentée par (113,99) la relation linéaire :

$$\Delta H^{o} = \alpha + T_c \Delta S^{o} \qquad (7)$$

α, ordonnée à l'origine de la droite (ΔH^{o}_{solv} en fonction de ΔS^{o}_{solv}) pourrait correspondre à la variation énergétique provenant du processus chimique. Exner (104) a utilisé une représentation logarithmique, soit des constantes d'équilibres, soit des constantes de vitesses (désignées par K) à deux températures T_1 et T_2, pour vérifier l'équation (7). Il a calculé ΔH et ΔS à partir des constantes d'équilibre et de vitesses obtenues expérimentalement à partir de l'équation suivante :

$$K = e^{\Delta S/R} \cdot e^{-\Delta H/RT} \qquad (8)$$

En effet on peut calculer ΔH et ΔS à partir des valeurs des K, K_1 et K_2 obtenues à deux températures T_1 et T_2 avec $T_2 \quad T_1$:

$$\Delta H = \frac{RT_1T_2}{T_2 - T_1} (\ln K_2 - \ln K_1) \qquad (9)$$

$$\Delta S = \frac{RT_2}{(T_2 - T_1)} (\ln K_2 - T_1/T_2 \ln K_1) \qquad (10)$$

En admettant l'équation (7) on peut alors écrire pour deux températures T_1 et T_2 à partir des équations (9) et (10) :

$$\ln K_2 = \frac{(T_2-T_1)}{(T_1-T_c)} \quad \frac{\alpha}{T_2 R} + \frac{(T_2-T_c)}{(T_1-T_c)} \quad \frac{T_1}{T_2} \ln K_1 \qquad (11)$$

Puisque ΔH est une fonction linéaire de ΔS (113,99) il en résulte que ΔG est une fonction linéaire de ΔH et on peut écrire :

$$\ln k(T) = - \frac{\alpha}{T_c R} + \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_c} - \frac{1}{T} \right) \qquad (12)$$

$$\Delta G(T) = \alpha \frac{T}{T_c} + \Delta H(T) \left(1 - \frac{T}{T_c} \right) \qquad (13)$$

Pour mettre en évidence la participation énergétique de la structure de l'eau liquide dans la réaction d'isomérisation, l'utilisation des solvants organiques semble particulièrement bien adaptée. En effet des études d'interaction de ces solvants avec l'eau ont fait l'objet d'un travail très précis (89). Nous nous sommes placés dans les mêmes conditions expérimentales que ces auteurs, à des fractions molaires en solvants organiques(alcools de C_1 à C_4) comprises entre $5,5 \times 10^{-3}$ et 9.10^{-2}.

Les solvants organiques sont des produits Merck. Le méthanol a été redistillé, alors que l'éthanol, le n-propanol, l'isopropanol et le n-butanol ainsi que ses

isomères ont été utilisés sans purification supplémentaire.

Le principe des mesures cinétiques a été décrit dans les chapitres précédents. Les k_{cat} sont exprimés soit en min^{-1} soit en sec^{-1}. Par addition des solvants organiques le pH des tampons phosphates croît (114). La correction pour l'activité de l'eau est négligeable devant les erreurs expérimentales. Cependant les changements sont petits. De plus nous avons vu qu'entre pH 6 et 9 ces changements peuvent être négligés.

La température est mesurée pendant toute la durée des expériences, avec une précision de 0,05° C.

L'effet des différents solvants organiques n'est pas dû à une dénaturation irréversible de l'isomérase. En effet, l'isomérase a été incubée en présence de ces différents solvants organiques à des concentrations variables entre 1 et 30 % v/v et pendant des temps allant de 1 à 60 minutes, à 25° C. Puis, l'activité de l'isomérase ainsi obtenue est mesurée dans les conditions standard. Elle est entièrement retrouvée par dilution. On travaille loin de la température de transition thermique "T_R" qui est voisine de 50° C (obtenue par des mesures d'activité et de fluorescence à différentes températures). L'enzyme est incubée à des temps variables entre 15 et 60° C, et à des concentrations croissantes en différents solvants organiques. L'activité est restaurée par dilution jusqu'à des temps d'incubation inférieures à 10 minutes. La dénaturation

thermique étudiée par fluorescence est réversible jusqu'à 50° C. L'addition des alcools abaisse T_R. Cependant jusqu'à 40°, nous sommes à l'abri d'une dénaturation irréversible, car ce travail a été effectué entre 15 et 37° C.

RESULTATS

Effets des différents solvants organiques sur les paramètres cinétiques de la réaction d'isomérisation.

I - Action des alcools à chaîne linéaire.

a - Effet de l'augmentation de la concentration en alcool.

Le méthanol, l'éthanol, le propanol primaire (n-propanol) ainsi que le butanol primaire (n-butanol) sont les alcools utilisés dans cette étude. Les vitesses initiales "v_i" d'isomérisation de la 5-androstènedione, de la 19-nor-5-androstènedione et de la 5-pregnènedione diminuent par augmentation de la concentration en ces différents alcools. Cependant en présence de méthanol les vitesses initiales passent par un maximum avec la 19-nor-5-androstènedione et la 5-prégnènedione. Les figures 36 et 37 montrent ces variations (74,75).

Pour avoir plus d'informations sur ces effets, nous avons déterminé les K_m, K_i et k_{cat} en présence de ces

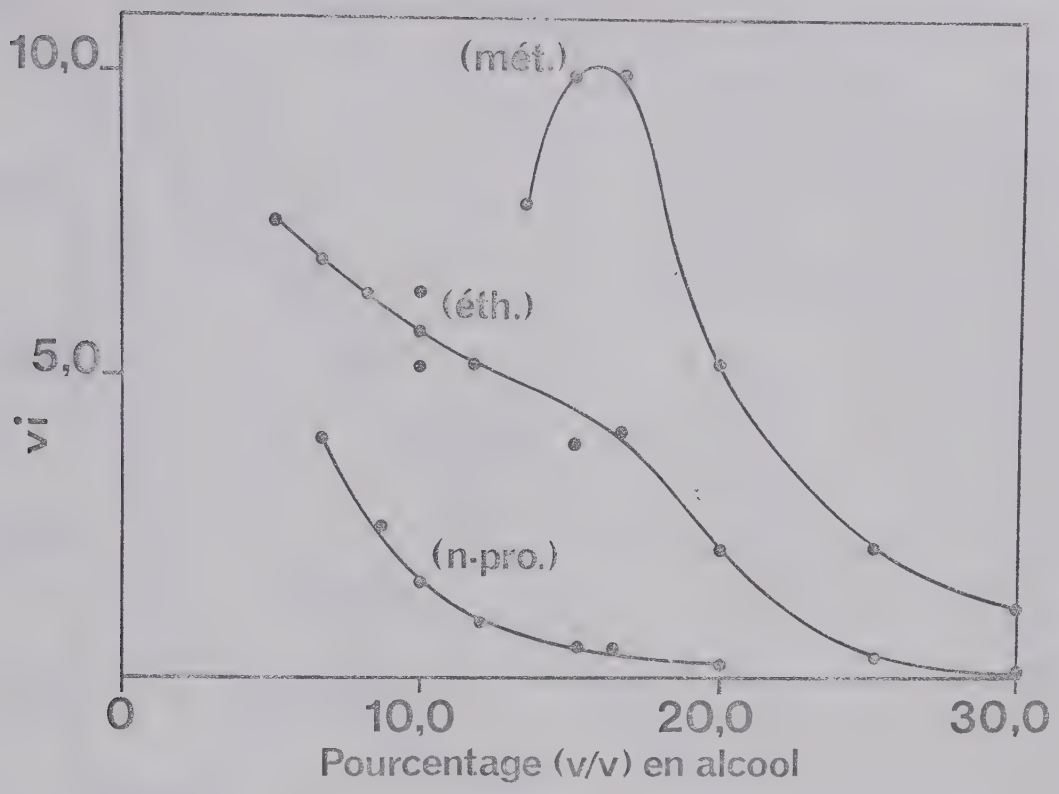


Figure 36

Effet du méthanol (méth), de l'éthanol (éth) et du n-propanol (n-pro) à 25° C, à pH 7,0 (tampon phosphate 0,03 M) sur la vitesse initiale d'isomérisation de la 5-prégnènedione 2,5 x 10^{-5} M. Les v_i sont exprimées en unités arbitraires par la variation de la D.O. à 248 nm par minute pour une concentration constante en isomérase.

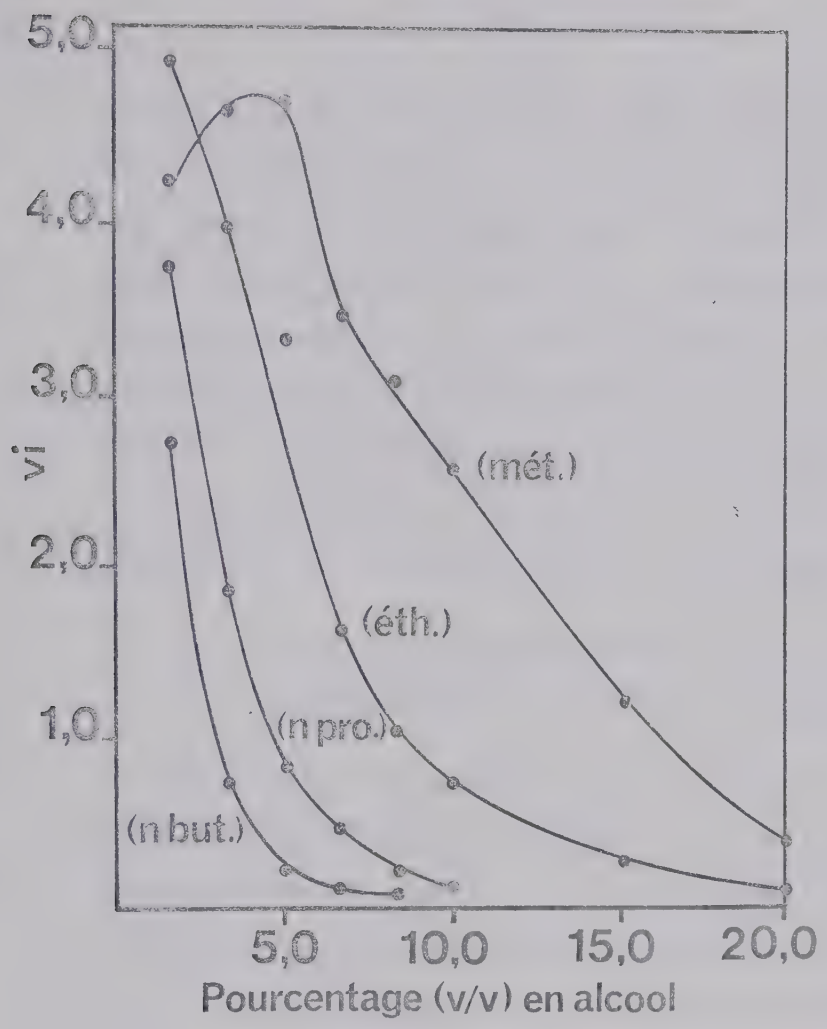


Figure 37

Effet du méthanol (méth), de l'éthanol (éth), du n-propanol (n-pro) et du n-butanol (n-but), de 3,3 à 20 % v/v, à 25° C, à pH 7,0, en tampon phosphate de potassium 0,03 M sur la vitesse initiale de l'isomérisation de la 19-nor-5-androstènedione 6,1 x 10^{-5} M.

Les v_i sont exprimées en unités arbitraires par la variation de la D.O. à 248 nm par minute (pour une concentration en isomérase constante).

alcools. Ces résultats figurent aux tableaux XI, XII, XIII et XIV. D'après ces différentes données, on voit que pour ces trois substrats et avec les différents alcools, $1/K_m$ ainsi que le k_{cat} décroissent par augmentation de la concentration en ces alcools. L'inhibition produite par ces alcools est donc du type mixte. En présence d'inhibiteurs compétitifs (oestradiol et deux de ses dérivés), le même phénomène est observé : l'affinité décroît par augmentation de la concentration en solvant (tableaux XII et XV).

b - Effet de l'augmentation de la longueur de la chaîne hydrocarbonée de l'alcool linéaire (de C_1 à C_4).

La figure 38 montre les variations de k_{cat} pour une même concentration de chaque alcool : 0,304 M, en fonction du poids moléculaire de l'alcool utilisé, du méthanol au n-butanol en passant par l'éthanol et le n-propanol. Le k_{cat} décroît quand la chaîne hydrocarbonée linéaire s'allonge, le méthanol étant pris comme référence. Par contre le K_m ne montre pas de variation significative. Le tableau XVI donne les paramètres cinétiques K_m et K_{cat} en présence de ces alcools de C_1 à n-C_4, pour l'isomérisation de la 5-androstènedione.

TABLEAU XI

Effet du méthanol sur les paramètres cinétiques de l'isomérisation de la 5-androstènedione.

MeOH % v/v	$\varepsilon_{25°}$	$k_{cat} \times 10^{-6}$ par min. 25°	K_m en moles/litre $\times 10^4$	$K_{P\,25°}$
1,23	78,0	22,0	1,25	10,0
3,3	77,2	14,7	3,0	7,0
6,6	76,1	9,55	3,70	5,87
10,0	75,0	6,8	7,15	5,10
13,3	74,0	5,95	9,10	4,3
15,0	73,35	4,48	12,5	4,0

Les expériences ont été effectuées à pH 7,0 en tampon phosphate de potassium 0,03 M, KCl 0,1 M et à 25° C.

ε est la constante diélectrique du mélange eau-méthanol (115).

K_p est le coefficient de partage à 25° C.

TABLEAU XII

Effet du méthanol sur l'inhibition compétitive de l'isomérase.

MeOH % v/v	K_i moles/litre x 10^6		
	O_{II}	O_{II} 17-Ac	17α-O_{II}
3,3	5,25	0,10	2,2
5,0	10,0	0,35	4,3
10,0	20,0	1,0	
15,0	50,0		30,0
16,6	65,0	3,75	56,0

Les expériences ont été effectuées à pH 7,0 en tampon phosphate de potassium 0,03 M, KCl 0,1 M et à 25° C. La 5-androstènedione est le substrat utilisé, les trois inhibiteurs compétitifs sont : l'oestradiol (O_{II}), le 17α-oestradiol (17α-O_{II}) et le 17-acétate d'oestradiol (17-Ac-O_{II}).

TABLEAU XIII

Effet de l'éthanol sur les paramètres cinétiques de l'isomérisation de la 5-androstènedione.

Ethanol % v/v	$\varepsilon_{25°}$	k_{cat} 25° en sec^{-1}	$K_m \times 10^4$ M 25°	$K_{P25°}$
1,85	77,7	$1,73 \times 10^5$	1,7	11,3
3,3	77,05	$1,32 \times 10^5$	2,0	7,45
5,0	76,2	$1,32 \times 10^5$	3,6	6,72
6,6	75,5	$1,07 \times 10^5$	5,0	
8,5	74,5	$9,85 \times 10^4$	9,0	
10,0	73,9	$6,87 \times 10^4$	12,5	5,35
15,0	71,35	$4,17 \times 10^4$	20,0	4,20

Les expériences ont été effectuées à pH 7,0 en tampon phosphate de potassium 0,03 M, KCl 0,1 M et à 25° C. ε est la constante diélectrique des mélanges eau-éthanol (115). K_p est le coefficient de partage à 25° C de la 4-androstènedione entre la phase iso-octane et la phase tampon phosphate et éthanol à concentrations variables.

TABLEAU XIV

Effet du n-propanol et de l'isopropanol sur les paramètres cinétiques de l'isomérisation de la 5-prégnènedione.

Solvant % v/v	K_m en moles/litre x 10^4		k_{cat} x 10^{-6} par min.		ε 25°	ε 25°
	n-PrOH	Iso-PrOH	n-PrOH	Iso-PrOH	n-PrOH	Iso-PrOH
10	1,0	1	2,46	5,35	73,1	72,75
20	5,0	5	0,265	2,35	67,45	66,8
30	10,0	12,0	0,0294	0,735	61,5	60,5

Les expériences ont été effectuées à pH 7,0 en tampon phosphate de potassium 0,03 M, KCl 0,1 M et à 25° C.

ε est la constante diélectrique des mélanges n-propanol-eau et isopropanol-eau (115).

TABLEAU XV

Effet du dioxane sur l'inhibition compétitive de l'isomérase.

dioxane		K_i en moles/litre x 10^4		
% v/v	25°	O_{II}	17α-O_{II}	17-Ac-O_{II}
10	68,7	1,8	0,15	0,012
15	64,1	4,0	1,10	0,045
20	59,9	8,8	1,6	1,0
30	50,6	20,0		

Les expériences ont été effectuées à pH 7,0 (en tampon phosphate de potassium 0,03 M et KCl 0,1 M à 25° C).

est la constante diélectrique du mélange eau-dioxane (115). Les 3 inhibiteurs compétitifs utilisés sont : l'oestradiol (O_{II}), le 17α-oestradiol (17α-O_{II}) et le 17-acétate d'oestradiol (17-Ac-O_{II}). La 5-pregnènedione est le substrat utilisé.

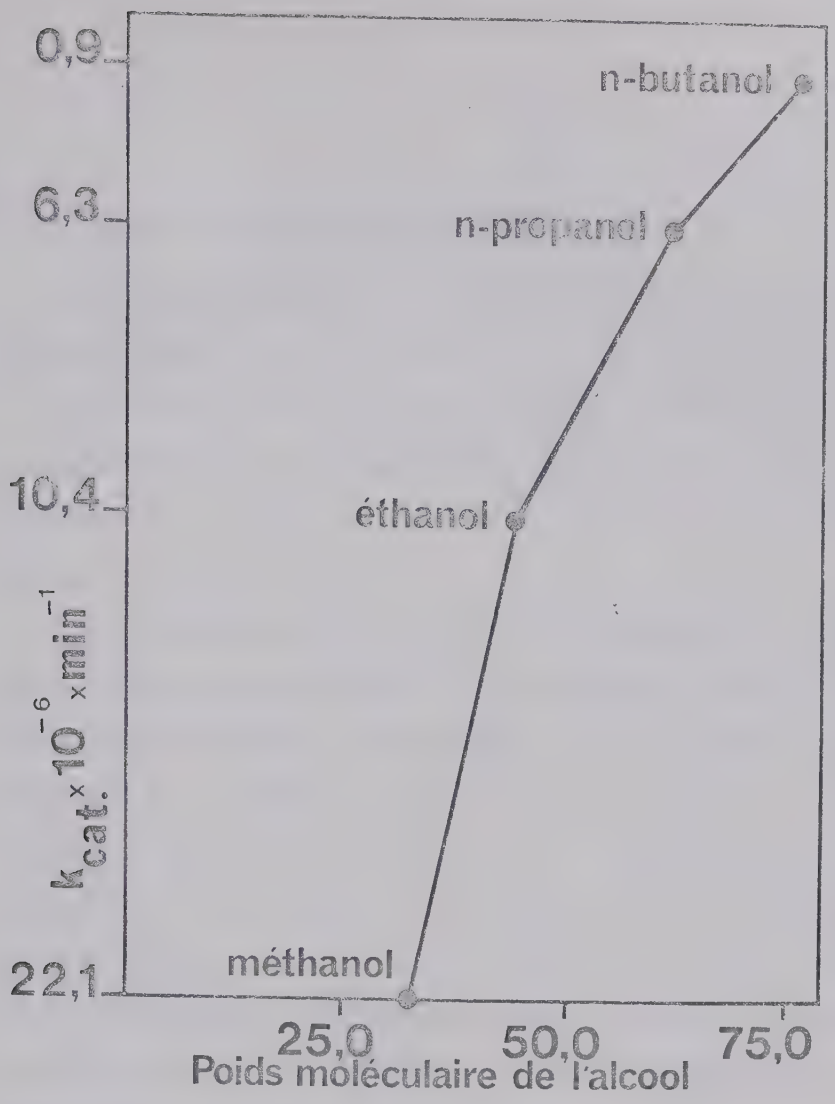


Figure 38

Courbe de la variation du k_{cat} de l'isomérisation de la 5-androstènedione en fonction du poids moléculaire de chaque alcool à la concentration 0,304 M (le méthanol est pris comme référence).
Les expériences sont effectuées à pH 7,0 (en tampon phosphate 0,03 M, KCl 0,1 M) et à 25° C.

II - Effets des alcools branchés.

Ces expériences ont été effectuées avec le n-propanol, l'isopropanol, le n-butanol et ses isomères.

Au tableau XVI figurent les paramètres cinétiques pour l'isomérisation de la 5-androstènedione, en présence des différents alcools linéaires et branchés, à la concentration 0,304 M.

Les tableaux XVII et XVIII donnent les K_m et les k_{cat} pour l'isomérisation de la 5-prégnènedione et la 19-nor-5-androstènedione, en présence du n-butanol et de ces isomères à la même concentration 0,304 M. D'après ces tableaux (XV,XVI,XVII et XVIII) on voit que les K_m ainsi que les K_p sont peu influencés par le branchement de la chaine hydrocarbonée. Par contre, le k_{cat} varie : sa variation croissante est directement reliée à l'augmentation du branchement de la chaîne hydrocarbonée de l'alcool considéré.

$$k_{cat}(\text{iso-prop}) > k_{cat}(\text{n-prop})$$

$$k_{cat}(\text{but-ter}) \geq k_{cat}(\text{but-sec}) \geq k_{cat}(\text{iso-but}) \geq k_{cat}(\text{n-but})$$

Si on calcule pour chaque alcool de C_1 à C_4, un coefficient d'efficacité "E_c" basé sur la diminution du k_{cat} pour l'isomérisation, rapporté à une unité de carbone, on

TABLEAU XVI

Paramètres cinétiques Km et k_{cat}, à la concentration 0,304 M en chaque alcool, pour l'isomérisation de la 5-androstènedione.

alcool	K_m en moles/litre x 10^{-4}	k_{cat} x 10^{-6} par minute	$Kp_{25°C}$	E_c
méthanol	2,56	22,1	10,0	1
éthanol	1,70	10,4	7,10	
n-propanol	4,35	6,3	7,30	
iso-propanol	4,20	10,3	7,10	
n-butanol	3,12	0,92	7,8	6
iso-butanol	2,85	1,26	8,0	
butanol-sec	3,12	2,50	7,70	
butanol-ter	3,3	7,35	7,9	1

Les expériences sont effectuées à pH 7,0, en tampon phosphate 0,03 M et KCl 0,1 M, à 25° C. E_c est le coefficient : E_c est égal au rapport du k_{cat} en méthanol (pris comme référence) au k_{cat} de chaque alcool, rapporté à une unité de carbone. K_p est le coefficient de partage à 25° C.

TABLEAU XVII

Paramètres cinétiques K_m et k_{cat} pour l'isomérisation de la 5-prégnènedione en présence de butanol normal et de ses isomères, à la concentration 0,304 M.

alcool	K_m en moles/litre x 10^5	k_{cat} x 10^{-6} par min.	K_p 25° C
n-butanol	2,0	3,96	90,0
iso-butanol	2,5	5,45	99,0
butanol-sec	2,8	6,17	90,0
butanol-ter	2,0	9,1	90,0

Les expériences sont effectuées en tampon phosphate de potassium 0,03 M et KCl 0,1 M, pH 7,0 et à 25° C.

TABLEAU XVIII

Paramètres cinétiques K_m et k_{cat} pour l'isomérisation de la 9-5-androstènedione en présence de butanol normal et de ses isomères à la concentration 0,304 M.

alcool	K_m en moles/litre x 10^4	k_{cat} x 10^{-6} par minute.
n-butanol	5,0	1,47
iso-butanol	5,0	1,47
butanol-sec	6,0	2,20
butanol-ter	6,0	9,2

Les expériences sont effectuées en tampon phosphate de potassium 0,03 M et KCl 0,1 M, à pH 7,0 et à 25° C.

observe que "E_c" ne devient significatif qu'à partir du n-butanol (C_4). En effet, pour l'éthanol (C_2) : E_c (éthanol) $\simeq$ E_c méthanol, le k_{cat}(méthanol) = 2,12 k_{cat}(éthanol). Pour le n-propanol (C_3) : E_c (propanol) = 1,17 E_c(méthanol), et k_{cat}(méthanol) = 3,48 k_{cat}(n-propanol), mais un carbone du n-butanol (C_4) est environ six fois plus efficace qu'un carbone du méthanol C_1, en effet, k_{cat}(méthanol)= 25 k_{cat} (n-butanol) ; l'effet de l'allongement de la chaîne linéaire est donc ici très important. Par contre avec une série branchée, un carbone du butanol tertiaire (C_4) a une efficacité moindre qu'un carbone du méthanol. k_{cat}(méthanol) = 3 k_{cat}(butanol-ter).

III - Le dioxane : son effet dans l'interaction protéine-stéroide.

La solubilité des stéroides est fortement augmentée par ce solvant. Son emploi facilite donc la saturation de l'isomérase en substrat. Les figures 39 et 39 bis montrent les variations de 1/v en fonction de 1/S à différentes concentrations en dioxane. Pour l'isomérisation de la 5-pregnènedione et de la 5-androstènedione, K_m croît et k_{cat} reste inchangé par augmentation de la concentration en dioxane. En présence de 5-androstènedione K_m passe de 1,67 x 10^{-4} M à 100 x 10^{-4}M, quand la concentration en dioxane varie de 1,7 à 20 % v/v, k_{cat} est de 12,9 x 10^6 min^{-1}.

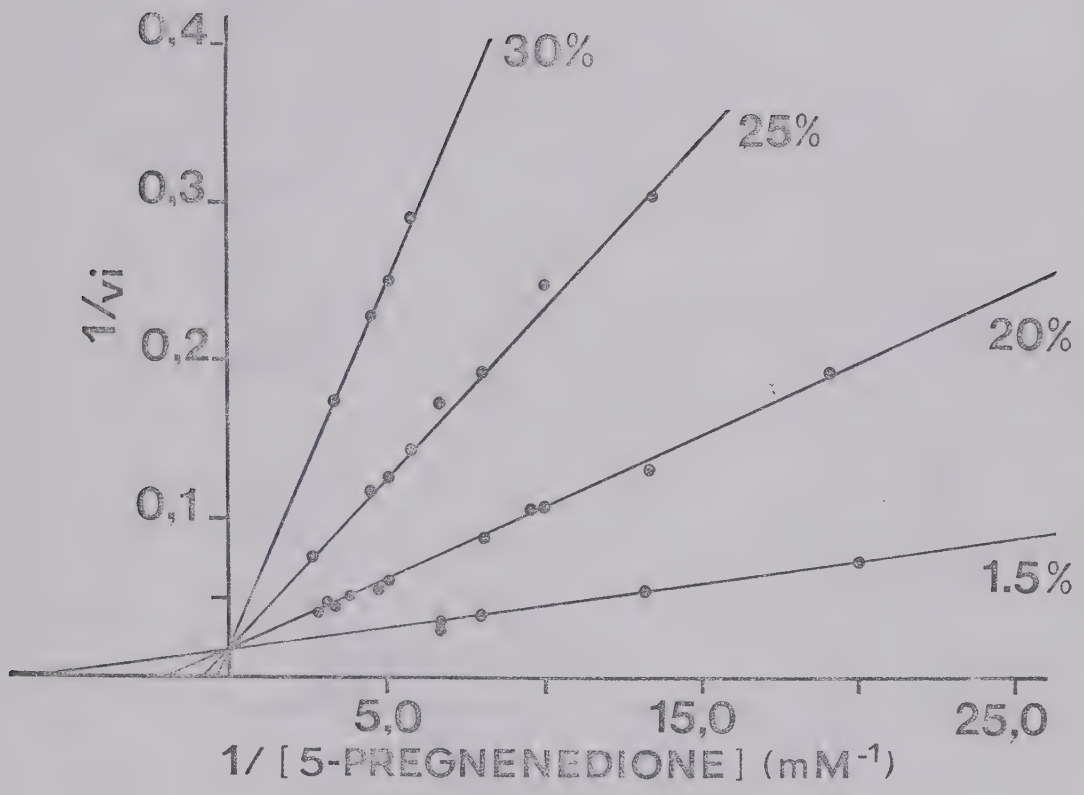


Figure 39

Représentation de Lineweaver et Burk, pour l'isomérisation de la 5-prégnènedione à différentes concentrations en dioxane. Les expériences ont été effectuées à 25° C, en tampon phosphate 0,03 M, KCl 0,1 M et à pH 7,0.

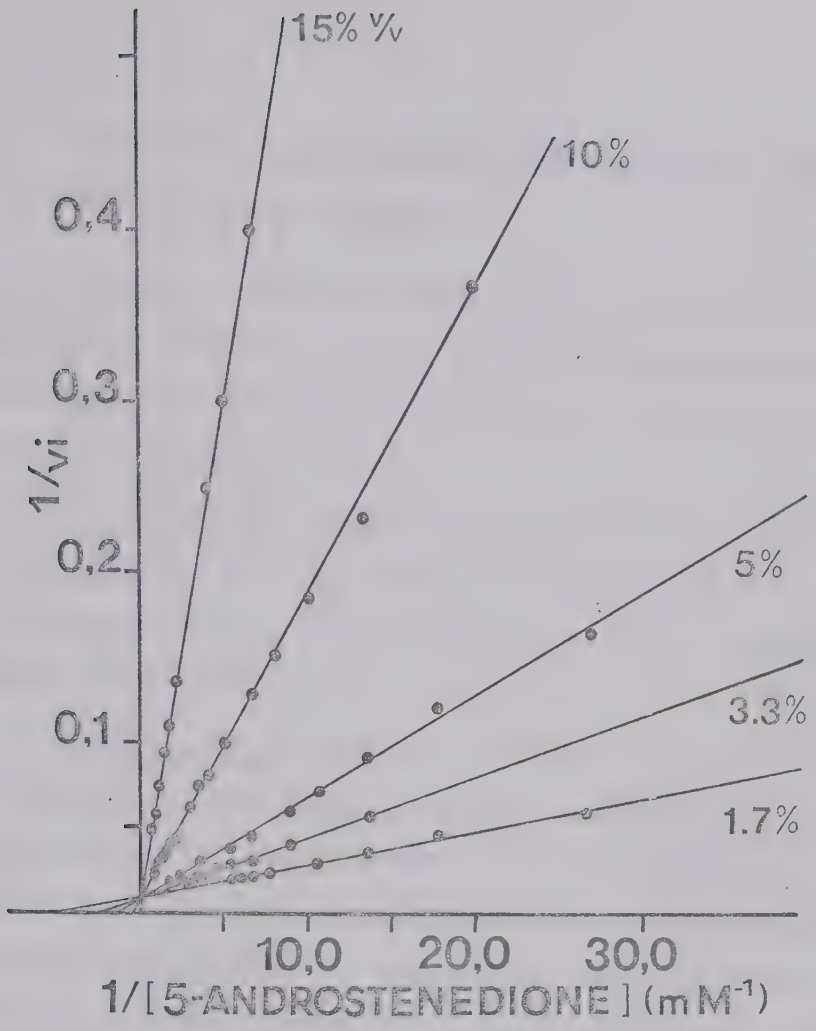


Figure 39 bis

Représentation de Lineweaver et Burk pour l'isomérisation de la 5-androstènedione à différentes concentrations en dioxane.

Conditions d'expérience : tampon phosphate 0,03 M, KCl 0,1 M, pH 7,0, 25° C.

IV - Relation entre la constante diélectrique et les paramètres cinétiques.

On sait que par addition des solvants organiques la constante diélectrique (ε) du milieu diminue. Les ε des mélanges eau-solvants organiques ont été pris dans les tables d'Akerlöf (115).

La figure 40 montre qu'il existe une relation linéaire entre log K_m et $1/\varepsilon$ pour l'isomérisation de la 5-androstènedione et la 5-prégnènedione à différentes concentrations en dioxane.

La figure 41 montre une relation linéaire entre le log K_i de l'oestradiol et $1/\varepsilon$ en présence de méthanol à des concentrations croissantes. La 5-androstènedione, ainsi que 3 inhibiteurs compétitifs ont été utilisés dans cette étude. Nous avons vu (page 81), qu'il y avait une relation directe entre le moment dipolaire de ces inhibiteurs et leur affinité ($1/K_i$) pour l'isomérase.

V - Données thermodynamiques pour les deux étapes de la réaction d'isomérisation.

Pour relier les variations des paramètres cinétiques dans les différents solvants organiques et dans le même solvant à des concentrations croissantes, aux variations de ΔH, ΔG et ΔS, des expériences à différentes températures ont été effectuées.

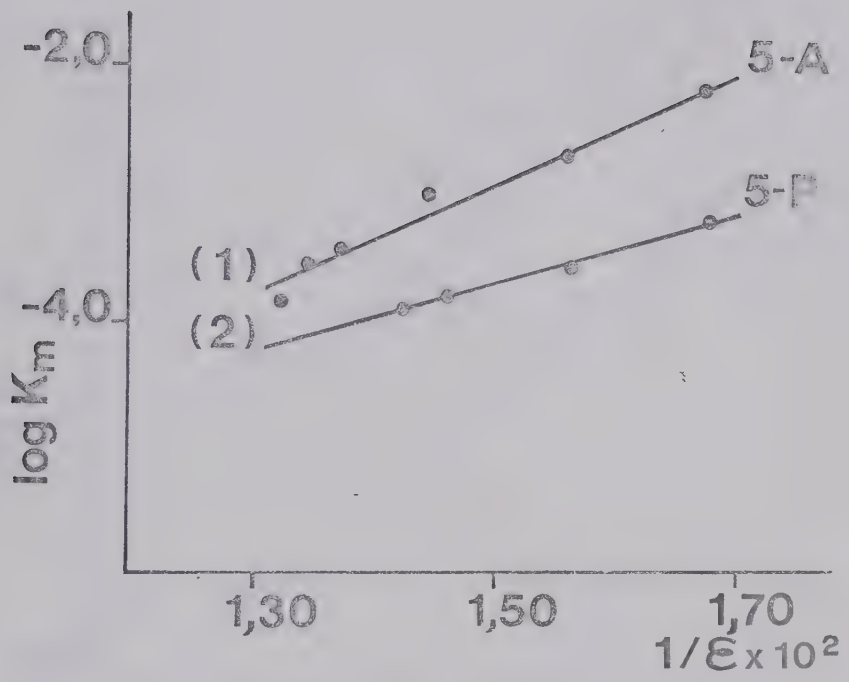


Figure 40

Variation de log K_m en fonction de $1/\varepsilon$ (à des concentrations croissantes en dioxane).
Les conditions expérimentales sont : tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0 et 25° C. Courbe (1) en présence de 5-androstènedione (5A) ; courbe (2) en présence de 5-prégnènedione (5P). Le dioxane est le solvant utilisé.

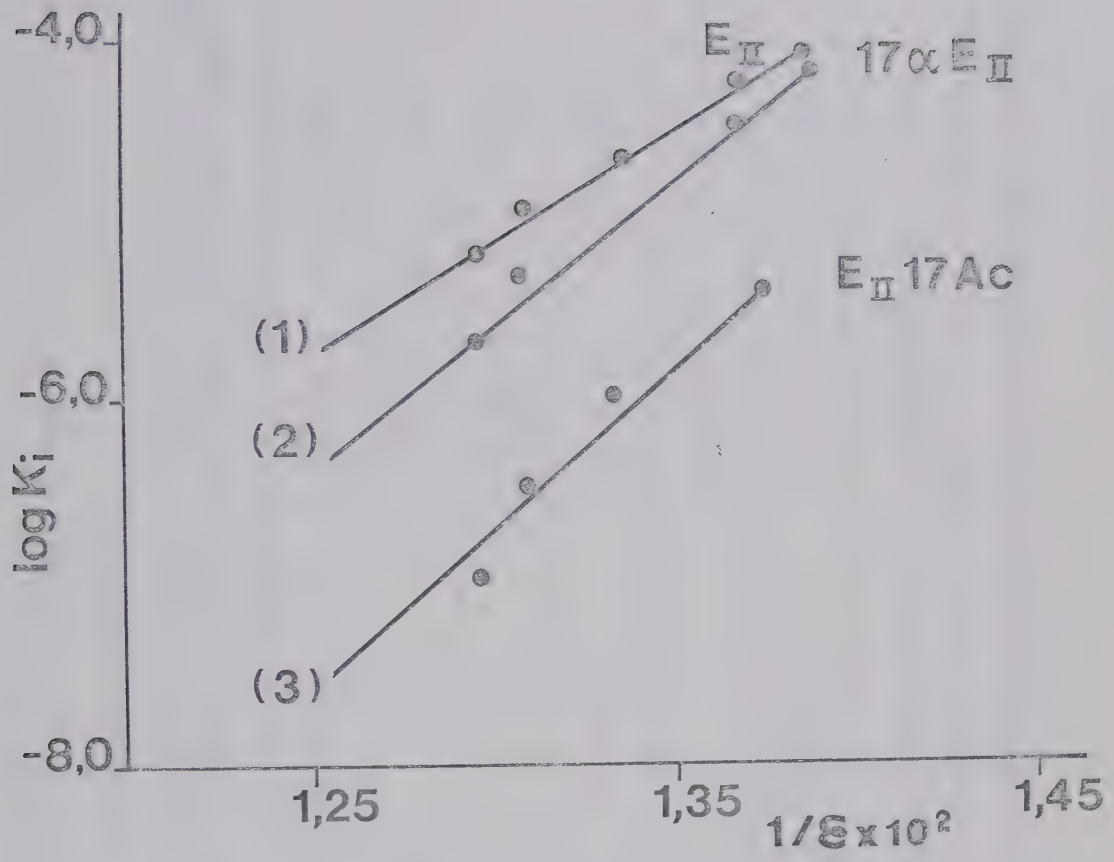


Figure 41

Variation de log K_i en fonction de $1/\varepsilon$ à des concentrations croissantes en méthanol.

Conditions expérimentales : tampon phosphate 0,03 M, pH 7,0 à 25° C. La 5-androstènedione est le substrat utilisé. Courbes : (1) oestradiol, (2) 17α-oestradiol, (3) 17-acétate d'oestradiol.

TABLEAU XIX

Valeurs des constantes thermodynamiques ΔH°, ΔG° et ΔS°, correspondant à l'association du complexe isomérase-oestradiol.

MeOH % v/v	$K_i \times 10^6$ 16.6°	$K_i \times 10^6$ 25°	$K_i \times 10^6$ 37°	ΔH° cal/mole	ΔG° 16.6° cal/mole	ΔS° 16.6° u.e	ΔG° 25° cal/mole	ΔS° 25° u.e	ΔG° 37° cal/mole	ΔS° 37 u.e
3,3	7,0	5,25	3,8	-5.400	-6.700	+ 5	-7,150	+ 5	-7.650	+ 7
5,0		10,0	5,0	-10.850			-6.800	+14	-7.540	+11
6,6		12,35	8,0	-6.100			-6,650	+ 2	-7,180	+ 3
10,0	25,0	20,0	12,5	-5.850	-6,040	+ 1	-6.380	+ 2	-6.870	+ 3
15,0		50,0	37,0	-4,500			-5,850	+ 5	-6.250	+ 6
16,6	73,5	65,0	44,0	-4.220	-5.400	+ 4	-5.680	+ 5	-6,150	+ 6

Les expériences ont été effectuées en tampon phosphate de potassium 0,03 M, KCl 0,1 M et à pH 7,0, entre 3,3 et 16,6 % v/v en méthanol. La 5-androstènedione est le substrat et l'oestradiol l'inhibiteur compétitif. Les K_i exprimés en moles/litre, ont été déterminés à partir des représentations de Dixon pour 4 concentrations en 5-androstènedione.

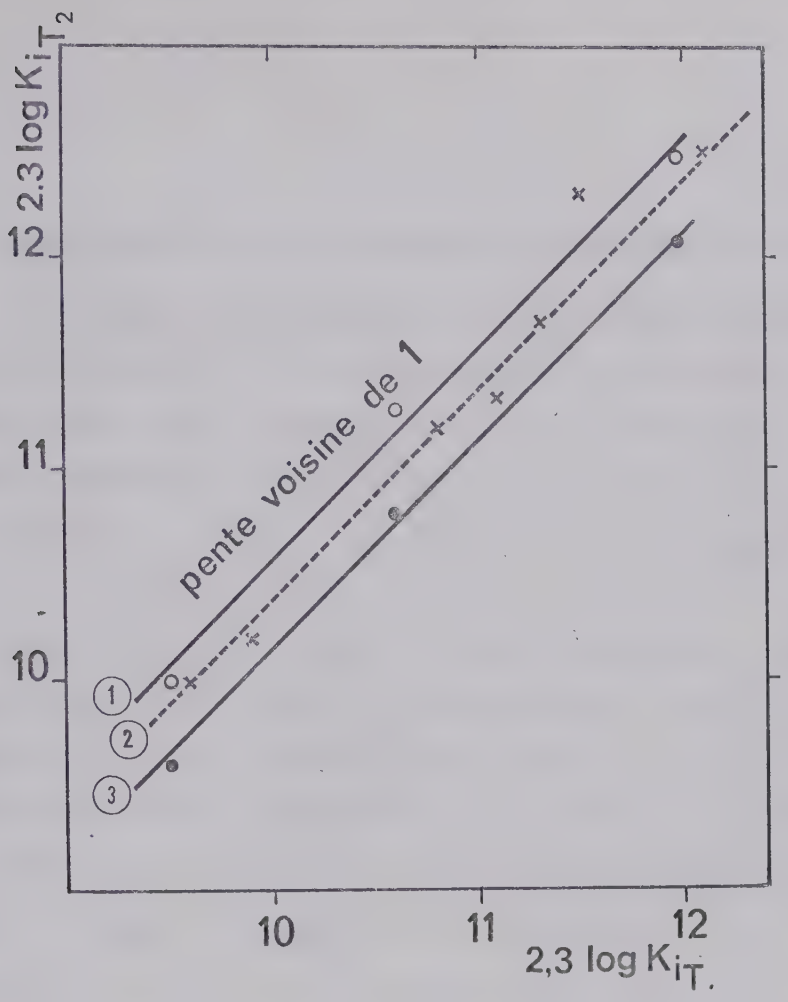


Figure 42

Représentation d'Exner pour la formation du complexe oestradiol-isomérase. Variation de 2,3 log K_{T_2} en fonction de 2,3 log K_{T_1} à différentes concentrations en méthanol. La 5-androstènedione est le substrat et l'oestradiol l'inhibiteur compétitif.

Courbes : (1) 16 , 6° et 37° C

(2) 25 et 37° C

(3) 16 , 6° et 25° C.

a) Formation du complexe isomérase-oestradiol.

Le tableau XIX donne les K_i à différentes concentrations en méthanol et à 3 températures, en présence de 5-androstènedione comme substrat, et de l'oestradiol comme inhibiteur compétitif. A concentration constante en méthanol la valeur de ΔS^o est la même aux trois températures étudiées (précision $\pm$ 2 u.e.)

La figure 42 montre la représentation d'Exner (équation (11)), 2,3 log K_{T_2} en fonction de 2,3 log K_{T_1}, pour trois paires de températures, avec $T_2 > T_1$, 298-289,6° K, 310-289,6° K et 310-298° K, et ceci pour différentes concentrations en cosolvant . Cette représentation est linéaire pour l'étape d'équilibre $E + I \rightleftharpoons EI$. Le T_c moyen a été calculé à partir de la pente $\frac{(T_2 - T_C)}{(T_1 - T_C)} \frac{T_1}{T_2}$ pour chacune de ces trois droites (par la méthode des moindres carrés). La pente moyenne pour ces droites est 1,0 $\pm$ 0,05, et le T_C moyen est voisin de zéro.

Les droites de compensation $\Delta H = \alpha + T_C \Delta S$ (99,113) qui devraient de ce fait être des horizontales ($T_C = 0$), ne le sont pas pour la formation du complexe E-I. C'est pourquoi on ne peut pas appliquer la classification de Hinshelwood (116) qui correspond au cas $T_C = 0$.

Le tableau XIX montre que ΔS^o passe par une valeur maximum pour 5 % v/v en méthanol, correspondant à une

fraction molaire de $2,2 \times 10^{-3}$ et ceci est observé pour les trois températures étudiées. La figure 43 montre les variations de ΔH^{o} en fonction de la concentration en méthanol (les ΔH^{o} sont calculées à partir des équations (9) et (10), et à partir des pentes des représentations d'Arrhenius log K_i en fonction de 1/T).

La figure 43 montre un ΔH^{o} maximum pour une fraction molaire en méthanol de $2,2 \times 10^{-3}$.

Cependant en raison de la complexité du système (présence de deux stéroides, substrat et inhibiteur), le phénomène de compensation n'a pas pu être mis en évidence dans l'étape de formation du complexe isomérase-oestradiol.

b - Etape d'activation

Le tableau XX donne les paramètres cinétiques pour le processus d'activation à différentes concentrations en éthanol et à trois températures, avec la 5-androstènedione comme substrat.

La figure 44 montre la représentation d'Exner, équation (11), 2,3 log K_{T_2} en fonction de 2,3 log K_{T_1} pour 3 paires de températures, avec $T_2 > T_1$, et ceci pour différentes concentrations en éthanol. Le T_C moyen est calculé à partir de la pente $\frac{(T_2 - T_C)}{(T_1 - T_C)} \frac{T_1}{T_2}$ de chacune des droites.

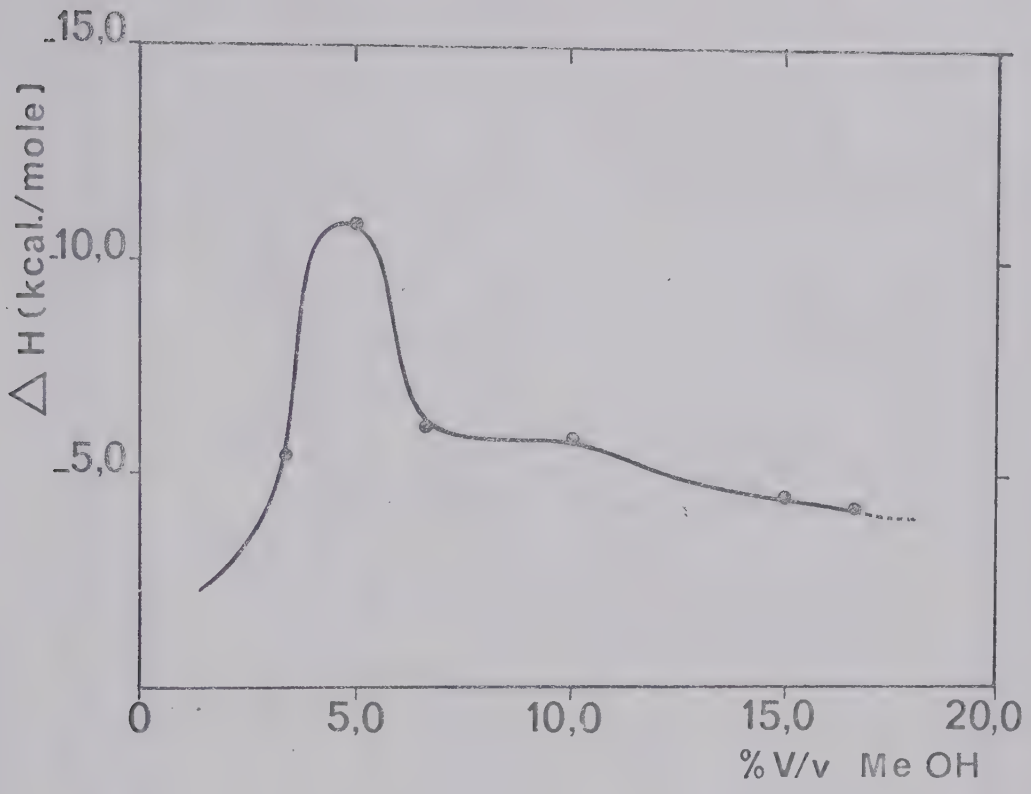


Figure 43

Variation de ΔH^{o} en fonction de la concentration en méthanol. La 5-androstènedione est le substrat et l'oestradiol l'inhibiteur compétitif.
Les conditions expérimentales sont : tampon phosphate 0,03 M, KCl 0,1 M, pH 7,0, K_i est le paramètre utilisé pour le calcul de ΔH^{o} à 3 températures différentes (16,6, 25 et 37° C).

TABLEAU XX

Valeurs des constantes thermodynamiques ΔG^*, ΔH^* et ΔS^* pour l'étape d'activation, pour l'isomérisation de la 5-androstènedione.

EtOH % v/v	$k_{cat.}$ 15°. en sec^{-1}	$k_{cat.}$ 25° en sec^{-1}	$k_{cat.}$ 37° en sec^{-1}	ΔH^* 37° cal/mole	ΔG^* 37° cal/mole	ΔS^* 37° u.e	ΔH^* 25° cal/mole	ΔG^* 25° cal/mole	ΔS^* 25° u.e	ΔH^* 15° cal/mole	ΔG^* 15° cal/mole	ΔS^* 1 u.
1,85		$1,73 \times 10^5$	$1,92 \times 10^5$	910,0	+7.750	- 22,0	920	7.560	- 22,0			
3,3	$1,02 \times 10^5$	$1,32 \times 10^5$	$1,73 \times 10^5$	2.385	+7.800	- 18	2.400	7.720	- 18	2.425	7.620	- 18
5,0	$7,05 \times 10^4$	$1,32 \times 10^5$	$1,55 \times 10^5$	4.485	+7.900	- 11	4.600	7.720	- 11	4.625	7.800	- 11
6,6	$3,25 \times 10^4$	$1,07 \times 10^5$	$1,55 \times 10^5$	6.385	+7.900	- 5	6.400	7.850	- 5	6.425	8.250	- 6
8,35	$3,06 \times 10^4$	$9,85 \times 10^4$	$1,35 \times 10^5$	7.385	+7.885	- 2	7.400	7.900	- 2	7.425	8.300	- 3
10,0	$1,485 \times 10^4$	$6,87 \times 10^4$	$1,23 \times 10^5$	9.385	+8.000	+ 4	9.400	8.140	+ 4	9.425	8.700	+ 2
15,0	$4,47 \times 10^3$	$4,17 \times 10^4$	$8,10 \times 10^4$	14.585	+8.300	+20	14.600	8.400	+ 21	14.625	9.400	+ 18

Les expériences ont été effectuées en tampon phosphate de potassium 0,03 M et KCl 0,1 M à pH 7,0 en milieu éthanolique entre 1,85 et 15 % v/v.

Les ΔH^* sont déterminées à partir des courbes d'Arrhénius ; les ΔG^* sont calculées à partir des lois des vitesses absolues.

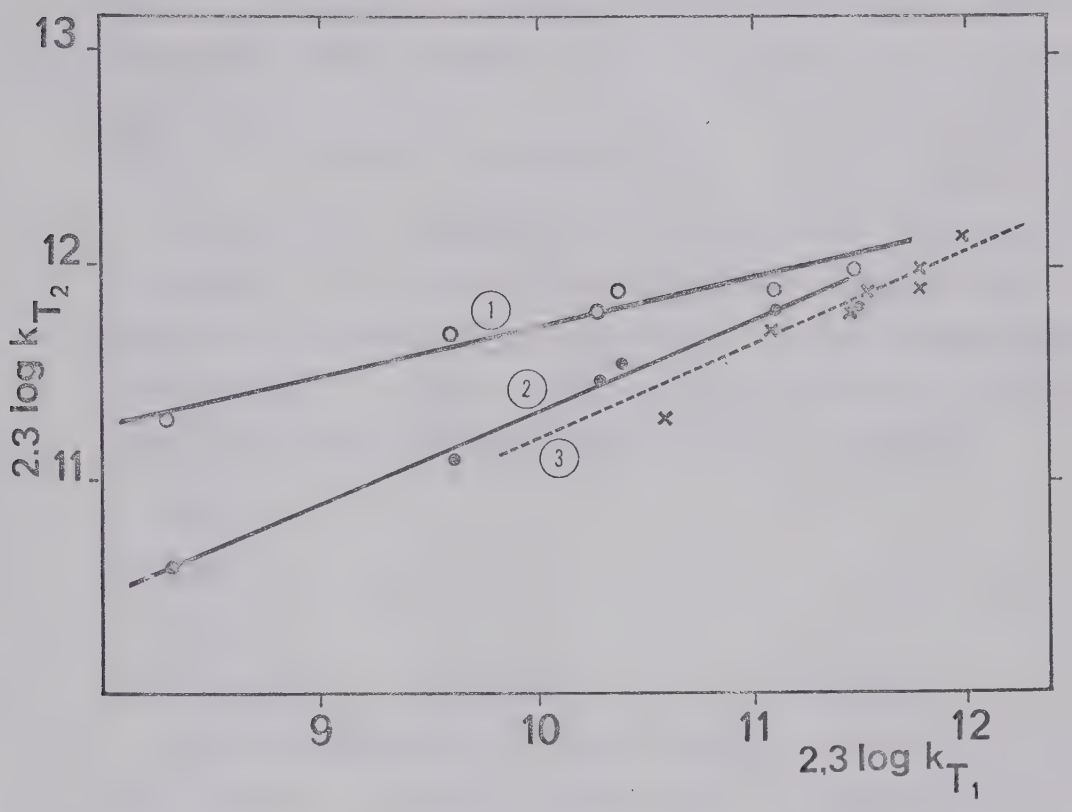


Figure 44

Représentation d'Exner pour l'étape d'activation de l'isomérisation de la 5-androstènedione. Variation de 2,3 log k_{T_2} en fonction de 2,3 log k_{T_1} à différentes concentrations en éthanol.

Courbes : (1) 15 et 37° C

(2) 15 et 25° C

(3) 25 et 37° C

La figure 45 donne les variations de ΔG^{*} en fonction de ΔH^{*}. Elles sont linéaires pour les trois températures étudiées : 288°, 298° et 310° K. La pente des trois droites $\frac{(T_C - T)}{(T_C)}$ permet de calculer T_C, $T_C = \frac{T}{1 - \text{pente}}$.

Dans cette représentation comme dans les autres le T_C moyen a été calculé par la méthode des moindres carrés sur une Olivetti Programma 101, à l'aide d'une droite de régression, $y = bx + a$. Voici un exemple de calcul de la pente pour la représentation de $\Delta G^{*} = f(\Delta H^{*})$.

$y = \Delta G^{*}$

$x = \Delta H^{*}$

b = pente

a = ordonnée à l'origine.

Chaque concentration en éthanol (tableau XX) a donné un y et un x en calories par mole. Le calcul a été fait avec 7 points (tableau XXI).

La pente est de 0,06 et l'ordonnée à l'origine est dz 7.506,69. Le T_C correspondant est de 316° K.

Le T_C moyen obtenu à partir de ces deux types de représentations et avec la méthode des moindres carrés est de 314 ± 10° K.

Les ΔG^{*} ont été calculés à partir des lois de vitesses absolues (63).

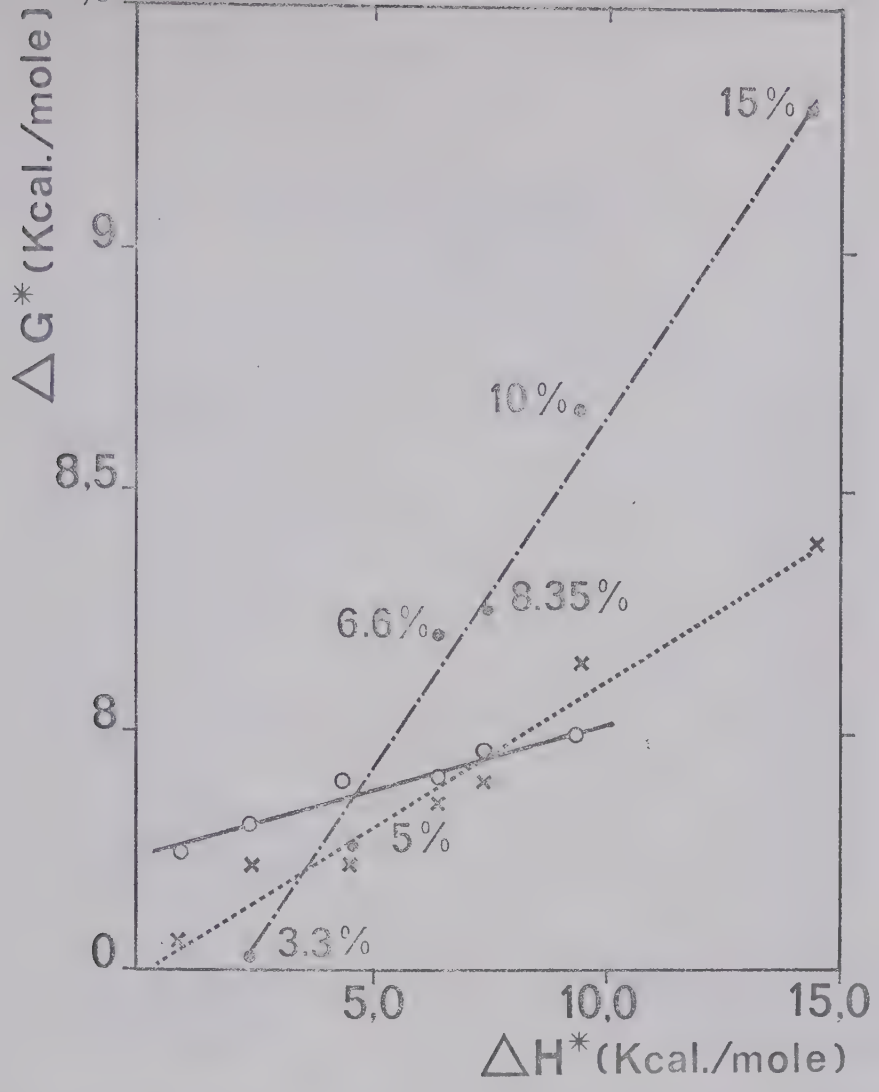


Figure 45

Variation de ΔG^* en fonction de ΔH^* à différentes concentrations en éthanol. Les expériences ont été effectuées en présence de tampon phosphate 0,03 M, KCl 0,1 M et pH 7,0. La 5-androstènedione est le substrat. Le k_{cat} est le paramètre cinétique choisi pour le calcul de ΔH^* et ΔG^* . Les pentes sont obtenues par la méthode des moindres carrés :

Courbes : ----- 15° C

o 25° C

● 37° C

Droite de régression

$$y = bx + a$$

Y	
15•75	A◊
-117871•05	A◊
0•97	A◊
1•20	A◊
7506•75	A◊
472586•25	◊
17899•47	A◊
6•00	◊
81747•62	A◊
108•06	A◊
5•00	◊
3579•89	A◊
22•61	A◊
132•01	A◊
0•00	A◊
34•13	A◊

V	
7560	S
920	S
7720	S
2400	S
7720	S
4600	S
7850	S
6400	S
7900	S
7400	S
8140	S
9400	S
8400	S
14600	S
W	
437202500•00	A◊
436712014•28	◊
490485•72	A◊
425006400•00	A◊
298616914•28	◊
126389485•72	A◊
368851200•00	A◊
361122685•71	◊
7728514•29	A◊
7•00	D◊
55290•00	B◊
7898•57	A◊
45720•00	C◊
6531•42	A◊
0•06	A◊
7506•69	A◊

Les ΔH^* ont été déterminés à partir des énergies d'activation expérimentales E (pages 91, 92). Les ΔS^* s'obtiennent par différence. La température moyenne expérimentale, qui est appelée "différence sur la pente", est égale à 298,6°K. Elle est très différente de la pente qui permet d'obtenir T_C. C'est pourquoi, on peut conclure, en accord avec différents auteurs (101,116,117,118), que le phénomène de compensation est réel pour cette étape d'activation. En accord avec la classification de Blackadder et Hinshelwood (117), nos résultats correspondent au cas 3a, où T_C est plus élevé que la température expérimentale la plus élevée (310° K). La pente est donc positive et les équations (11) et (13) sont vérifiées.

La réactivité "R" est définie par le rapport de k_{cat} pour une faible concentration en co-solvant (3,3 % v/v éthanol) au k_{cat} à une plus forte concentration en co-solvant (15 % v/v). Cette réactivité diminue lorsque la température croît. A partir du tableau XX nous avons obtenu les rapports suivants :

$$\text{à } 15° \text{ C} \quad R = \frac{k_{cat} \text{ 3,3 \% v/v éthanol}}{k_{cat} \text{ 15 \% v/v éthanol}} \quad \text{est de } 22,8 \text{ ,}$$

ce qui correspond à un effet très important de l'alcool sur le k_{cat}. A 25° C ce rapport R n'est plus que de 4,15 et à 37° C il est de 2,35. Cette diminution de la réactivité

en fonction de la température pour une même zone en co-solvant, est en faveur de l'existence du phénomène de compensation dans l'étape d'activation.

Par contre la réactivité ne varie pas d'une façon significative pour la formation du complexe E-I,

$$R = \frac{K_i \text{ (3,3 \% v/v en méthanol)}}{K_i \text{ (15,6 \% v/v en méthanol)}}$$ est de 10,5 à 15° C, 12,4 à 25° C et 11,6 à 37° C.

Ces résultats paraissent confirmer la participation énergétique du milieu solvant aqueux à la réaction d'isomérisation enzymatique. Bien que l'addition des solvants organiques en concentrations croissantes augmente la solubilité des stéroides, leur effet sur les paramètres cinétiques est en contradiction avec une augmentation de la solubilité. En effet l'affinité et le k_{cat} diminuent par augmentation de la concentration des différents solvants au lieu d'augmenter.

L'addition des solvants organiques diminue la constante diélectrique du milieu ainsi que l'affinité des stéroides pour l'enzyme. En accord avec les études de Bell (119), concernant les molécules non chargées possédant un moment dipolaire (μ), on peut concevoir que les interactions électrostatiques
réaction d'isomérisation.

Le moment dipolaire du stéroide substrat ou analogue de substrat pourrait contribuer à l'orientation de ces stéroides par rapport au site actif. Cependant les variations de la constante diélectrique et les interactions électrostatiques impliquées dans la formation du complexe ne peuvent entièrement expliquer les effets produits par ces solvants organiques et encore moins les effets sur l'étape d'activation. Nous avons vu que le branchement de la chaîne hydrocarbonée modifie d'une manière significative le k_{cat}, alors que le K_m n'est pratiquement pas affecté. Or avec la série du propanol, le n-propanol de constante diélectrique plus élevée que l'isopropanol est un meilleur inhibiteur que ce dernier. Dans la série du butanol, le butanol tertiaire qui a la plus faible constante diélectrique parmi ses isomères, est le plus mauvais inhibiteur.

La diminution de l'affinité des stéroides pour l'enzyme, soit en fonction de leur polarité propre, soit en fonction de la polarité du solvant, peut s'expliquer en partie par des interactions hydrophobes qui sont en accord avec la variation du K_p de ces stéroides.

Le dioxane est le seul solvant organique qui agit comme inhibiteur compétitif. Ceci pourrait être relié à sa similitude structurale avec les stéroides, car il peut se dimériser . C 'est un éther cyclique avec deux groupes

polaires et il peut s'établir de ce fait de fortes interactions soluté-soluté (89).

Les effets de l'allongement et du branchement de la chaîne hydrocarbonée des alcools de C_1 à C_4 que nous avons observés ont lieu dans le même sens que leur facilité d'accepter des protons qui est : méthanol éthanol n-propanol butanol-ter. Cependant, l'efficacité est plus faible pour le butanol tertiaire que pour le n-butanol, si bien que l'effet du branchement de la chaîne hydrocarbonée de l'alcool s'exerce en sens opposé de l'effet de l'allongement de la chaîne hydrocarbonée de l'alcool. Ceci peut être relié aux effets produits par l'alcool branché sur la structure de l'eau (89).

L'effet du butanol tertiaire sur la désolvatation de l'imidazole a été étudié par Ralph et Grünwald (120). Ces auteurs montrent que dans des mélanges eau-butanol tertiaire la réaction

$$\text{Imidazole-H-O(H)} \cdot \text{H-O(H)-H} \cdot \text{Imidazole}^{(+)}\,(\text{aqueux}) \underset{\longleftarrow}{\overset{(1)}{\longrightarrow}}$$

$$\text{Imidazole-H-O(H)-H} \cdot \text{Imidazole}^{(+)}\,(\text{aqueux}) + H_2O\,(\text{aqueux})$$

va de gauche à droite.

C'est pourquoi, l'action des alcools sur le changement de la structure de l'eau liquide (eau liée eau monomérique) nous semble importante dans cette étude, ces effets étant en compétition avec ceux des stéroides.

Cependant la participation du solvant aqueux dans le mécanisme enzymatique semble différente pour les deux étapes de la réaction.

Selon Belleau et Lavoie (121-122), des variations de - 10 à + 20 unités entropiques ne correspondent qu'à l'implication de quelques molécules d'eau au niveau du site actif. Dans l'étude présente, des variations entropiques plus importantes ont été observées dans l'étape d'activation, le ΔS^{*} variant de - 20 à + 22 u.e.

Il ressort donc de ces résultats que les alcools agissent plus spécifiquement au niveau du transfert de proton, défini par le k_{cat} qui est l'étape limitante.

CHAPITRE IV

ANALOGIE ENTRE LA PROTEINE DU "RECEPTEUR" UTERIN POUR LES OESTROGENES ET L'ISOMERASE.

Dans le plasma humain, les hormones stéroïdes sont liées à des protéines spécifiques :"les protéines de transport". La transcortine ou CBG (Corticosteroid Binding Globuline) transporte cortisol et progestérone (123-126). La "SBP ou sex steroid binding plasma protein transporte avec une grande affinité l'androstanolone et la testostérone et avec une affinité moindre les oestrogènes (127). L'hormone pénètre ensuite dans le tissu cible, prostate ou utérus (128). Dans le cytoplasme de l'endomètre utérin, l'oestradiol est lié à une macromolécule protéique soluble dite "Récepteur cytosolique" qui sédimente à une vitesse de 8 S. Ce récepteur cytosolique est très difficile à purifier. Pour étudier les types d'interactions entre cette macromolécule du récepteur cytosolique et les stéroides hormonaux, il est nécessaire de l'avoir pure. Actuellement cette protéine est en cours de purification.

Or, l'isomérase pure et cristallisée présente des analogies avec ce "Récepteur". En particulier les mêmes oestrogènes se lient à ce récepteur et à l'isomérase.

Cependant les affinités respectives des stéroïdes sont différentes pour les deux protéines ; elles sont beaucoup plus grandes pour le récepteur que pour l'isomérase. Pour l'isomérase ces oestrogènes sont des analogues de substrats.

Cas du diéthylstilboestrol (DES)

Le DES est un oestrogène de synthèse. Il a une activité en tout point semblable à celle de l'oestradiol oestrogène naturel. Le DES est un inhibiteur compétitif de l'isomérase. L'oestradiol et le DES ont la même affinité pour l'isomérase. A pH 7,0, en tampon phosphate de potassium 0,03 M, à 25°, en méthanol 5 et 10 % v/v, les K_i sont pour le DES comme pour l'oestradiol respectivement de 10×10^{-6}M et 20×10^{-6} M. Le DES se comporte comme l'oestradiol, son affinité décroît par augmentation de la concentration en méthanol. Ces deux molécules qui ont des structures différentes se fixent au même site. Le mécanisme de cette interaction n'est pas encore élucidé. En collaboration avec Mr. Hospital nous avons essayé de relier la structure moléculaire et l'activité oestrogène (129).

En 1938, Dodds, Robinson, Goldberg et Lawson (130) ont suggéré une explication pour la grande activité du diéthylstilboestrol (DES), à savoir : sa grande analogie de structure avec l'oestradiol hormone naturelle. En fait le DES peut exister sous deux formes isomères, cis-trans, la

forme trans possédant une plus grande analogie de structure avec l'hormone naturelle. C'était le point de départ de la "Théorie spatiale de l'activité oestrogène" proposée par M. Jacques (131). Il manquait à cette théorie des preuves décisives, telles que l'analyse de la structure moléculaire aux rayons-X. Dans le travail (129), on montre que le DES ne possède une analogie de structure avec l'oestradiol, que dans certaines conditions. Nous suggérons que cette forme du DES "oestradiol-ressemblante" est la forme active.

Le DES a été cristallisé dans différentes conditions, et sa structure moléculaire a été analysée aux rayons X. On y montre que le DES a une structure épaisse et symétrique avec deux phénols à chaque extremité, structure qui est très différente de celle de l'oestradiol. Il est alors difficile de concilier cette différence de structure avec l'analogie de liaison avec le Récepteur d'oestrogènes dans les fractions cytosoliques, et dans les protéines sans histones des chromatines (12). Cependant, quand le DES est cristallisé à partir d'un mélange méthanol eau, une molécule de DES cristallise avec une molécule d'alcool et une molécule d'eau, et de ce fait elle devient asymétrique et acquiert une structure ressemblant davantage à celle de l'oestradiol (129). Cette molécule de DES solvatée asymétrique pourrait représenter la conformation "active".

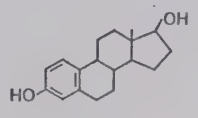
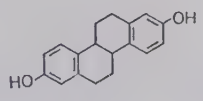
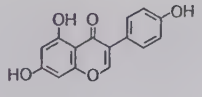
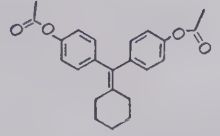
Nous suggérons que dans le cas de l'isomérase et du récepteur utérin, le DES, molécule flexible, peut se transconformer et prendre une forme appelée "active" ressemblant à l'hormone naturelle. Cette transconformation se ferait seulement au niveau des protéines de liaison impliquées dans des effets hormonaux. En collaboration avec Madame Vincent, nous avons continué l'étude de l'analogie du Récepteur cytosolique et de l'isomérase. Nous avons comparé les affinités pour l'isomérase des différents composés oestrogènes qui avaient été étudiées sur le Récepteur (132). Le tableau XXI donne quelques composés et leurs affinités pour l'isomérase et le Récepteur.

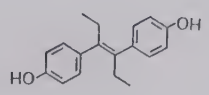
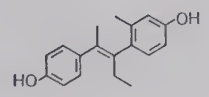
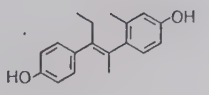
On ne sait comment une telle forme active du DES est induite au niveau des sites de liaison du récepteur hormonal et de l'isomérase.

On peut cependant remarquer que toutes les protéines qui lient l'oestradiol ne lient pas forcément le DES. En effet, la SBP, protéine du plasma humain liant les hormones sexuelles, lie l'oestradiol et non le DES.

TABLEAU XXI

Inverses des affinités (K_i) des oestrogènes se liant à l'isomérase et au récepteur d'oestradiol cytosolique utérin (a).

Composé	formule	K_i en moles/litre Récepteur[(a)]	K_i en moles/litre Isomérase[(b)]
1) Oestradiol		$1,0 \times 10^{-10}$	20×10^{-6}
2) Diphénol		$1,0 \times 10^{-8}$	15×10^{-6}
Hormones végétales			
3) Génistéine		$3,6 \times 10^{-7}$	$6,3 \times 10^{-6}$
4) Cyclofénil		6×10^{-9}	40×10^{-6}

Composé	formule	K_i en moles/litre Récepteur[(a)]	K_i en moles/litr Isomérase[(b)]
Dérivés des stilbènes			
5) Diéthylstilboestrol		$1,8 \times 10^{-10}$	20×10^{-6}
6) 2'-7'-diméthyl-7-éthyl-stilboestrol (ressemblant à l'oestradiol) DES "O_{II} like"		$2,0 \times 10^{-10}$	14×10^{-6}
7) 2'-7-diméthyl-7'-éthyl-stilboestrol (ressemblant à l'oestradiol) DES "O_{II} like"		$2,0 \times 10^{-10}$	19×10^{-6}

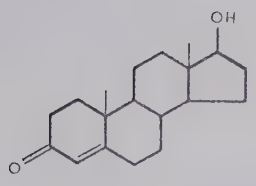
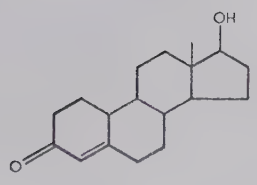
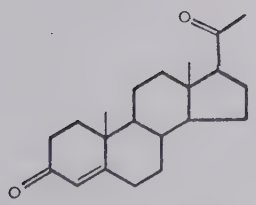
(a) Les expériences ont été effectuées à pH 7,4 en tampon Tris (HCl) 0,01 M et EDTA 0,0015 M (131).

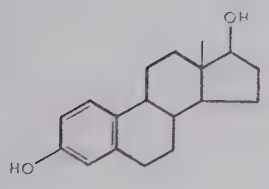
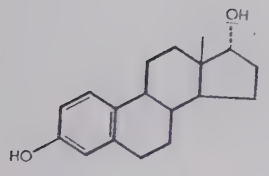
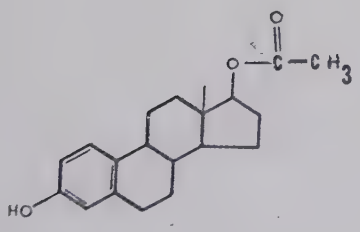
(b) Les expériences ont été effectuées en tampon phosphate 0,03 M pH 7,0 et en méthanol 10 % v/v.

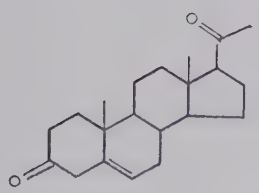
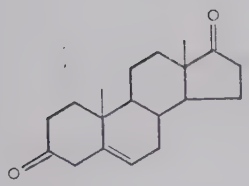
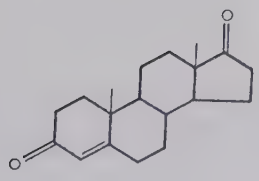
Tous ces dérivés sont des inhibiteurs compétitifs de l'isomérase. Les K_i ont été déterminés à partir de la représentation de Dixon avec 4 concentrations en 5-androstènedione.

Dans ce travail nous avons pu décrire la structure d'une protéine enzymatique en absence et en présence d'analogues de substrat par un grand nombre de méthodes physico-chimiques actuellement utilisables et montrer, à partir des considérations thermodynamiques, la participation du solvant aqueux dans l'énergétique de la réaction.

Liste des appellations courantes des stéroides, formules et abréviations(133).

Composé et formule	Nomenclature normalisée	Abréviation
 Testostérone	17β-hydroxy-4-androstène-3-one	T
 19-nor-testostérone	19-nor-17β-hydroxy-4-androstène-3-one	19-nor-T
 Progestérone	4-pregnène-3,20-dione	Δ^4-pregnènedion Δ^4P

Composé et formule	Nomenclature normalisée	Abréviation
 17β-oestradiol	oestra 1,3,5(10)-triène-3,17β-diol	Oestradiol O_{II}
 17α-oestradiol	oestra-1,3,5(10)-triène-3,17α-diol	17α-oestradiol α-O_{II}
 17β-acétate-oestradiol	oestra-1,3,5(10)-triène-3-hydroxy-17β-acétate.	17-acétate-O_{II}

Composé et formule	Nomenclature normalisée	Abréviation
 Δ^5-prégnène-3,20-dione	5-prégnène-3,20-dione	5-prégnènedione Δ^5P
 Δ^5-androstène-3,17-dione	5-androstène-3,17-dione	5-androstènedion Δ^5A
 Δ^4-androstène-3,17-dione	4-androstène-3,17-dione	4-androstènedion Δ^4A

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 - Talalay, P., and Wang, F.S., Biochim. Biophys. Acta (1955) 18, 300.

2 - Ringold, J., and Malhotra, S.K., J. Amer. Chem. Soc. (1965), 87, 3228.

3 - Wang, S.F., Kawahara, F.S., and Talalay, P., J. Biol. Chem. (1963), 238, 576.

4 - Boyer, J., Thèse à l'Université de Marseille (1968).

5 - Benson, A.A., Suruda, A.J., Jarabak, R. and Talalay, P., 162nd. A.C.S. National Meeting, Washington (1971) Sept. 13-17.

6 - Archibald, W.J., J. Phys. Colloid. (1947), 51, 1204.

7 - Kawahara, F.S., Wang, S.F., and Talalay, P., J. Biol. Chem. (1962), 237, 1500.

8 - Boyer, J. and Talalay, P., J. Biol. Chem. (1966) 241 180.

9 - Geynet, Ph., Gallet, J., and Alfsen, A., 5th Meeting of the International Study Group for Steroid Hormones, Rome 6-8 Décembre 1971.

10 - Samuels, L.T., Ushikawa, T., "The Adrenal Cortex", Eisenstein, A.B. Ed., Little Brown and Company (1967).

11 - Eik-Nes, K.B., "The Androgens of the Testis" (K.B. Eik-Nes Ed.) Marcel Dekker, Inc., New York (1970).

12 - Baulieu, E.E., and Alberga, A., Biochemistry (1971) 10, 3835.

13 - Tait, M.J., and Frenks, F., Nature (1971), 230, 91.

14 - Talalay, P., and Boyer, J., Biochim. Biophys. Acta (1965), 105, 389.

15 - Sober, H.A., Gutter, F.J., Wyckoff, M.M. and Perterson, E.K., J. Amer. Chem. Soc. (1956) 78, 576.

16 - Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., J. Biol. Chem. (1951), 193, 265.

17 - Yanaris, S., and Bovey, F.A., J. Biol. Chem. (1960) 235, 2818.

18 - Foss, J.G., Biochim. Biophys. Acta (1961) 47, 569.

19 - Wetlaufer, D.B., Adv. in Protein Chemistry (1962) 17, 303.

20 - Beaven, G.H., and Holiday, E.R., Adv. in Protein Chemistry (1952), 7, 320.

21 - Doty, P., and Geiduschek, P., "The Proteins" (1953), I, part A, 393, Academic Press Inc. New York.

22 - Herskowitz, T.T., "Methods in Enzymology" (1967) XI, 748.

23 - Herskowitz, T.T., and Laskowski, J.R., J. Biol. Chem. (1962) 237, 2481.

24 - Bayliss, N.S., and Mc.Rae, E.G., J. Phys. Chem. (1954), 54, 1002, 1006.

25 - Mc.Rae, E.G., J. Phys. Chem. (1957) 61, 562.

26 - Herskowits, T.T., and Laskowski, J.R., J. Biol. Chem. (1961) 235, PC.57.

27 - Klotz, I., Arch. Biochem. Biophys. (1970) 138, 704.

28 - Browne, W., North, J., Phillips, A.C.T.H., Brew, D.C., Vanaman, K., and Hill, R.L., J. Mol. Biol. (1969), 42, 65.

29 - Underfriend, S. , "Fluorescence essay in Biology and Medecine" (1962), Sidney N.Y., Acad. Press.

30 - Weber, G., and Teale, F.W.S., Trans. Faraday Soc. (1957) 53, 646.

31 - Teale, F.W.S. and Weber, G., Biochem. J. (1957) 65, 476.

32 - Konev, S.V., Döklady. Acad. Nauk. S.S.S.R. (1957) 56, 116, 594.

33 - Cowgill, R., Biochim. Biophys. Acta (1966) 120, 189.

34 - Cowgill, R., Biochim. Biophys. Acta (1966) 120, 550

35 - Lehrer, S.S. and Fasman, G.D., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1966) 23, 133.

36 - Beychok, S., Annual Rev. of Biochem. (1968), 37, 437.

37 - Townend, R., Kumosinski, T.F., Timasheff, S.N., Fasman, G.D. and Davidson, B., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1966) 23, 163.

38 - Quadrifoglio, F., and Urry, D.W., J. am. Chem. Soc. (1968), 90, 2760.

39 - Li, L.K. and Spector, A., J. Am. Chem. Soc. (1969), 91, 220.

40 - Holzwarth, G., and Doty, P., J. Amer. Chem. Soc. (1965), 87, 218.

41 - Sheard, B., and Bradbury, E.M., Progress in Biophysics and Molecular Biology (1970), 20, 187.

42 - Urry, D.W., Spectroscopic approaches to Biomolecular conformation. Edited by Urry D.W., Published by the Amer. Med. Assoc.

43 - McConnald, C.C. and Phillips, W.D., J. Am. Chem. Soc. (1969), 91, 1513.

44 - Alfsen, A., C.R. Trav. Lab. Carlsberg (1963), 33, 415.

45 - Weber, K. and Osborne, M.,J. Biol. Chem. (1969), 244, 440.

46 - Perutz, M.F., J. Mol. Biol. (1965), 13, 646.

47 - Waugh, D., Adv. in Protein Chemistry (1954),4, 325.

48 - Fisher, H.F., Proc. Nat. Acad. Sci. (1964), 51, 1285.

49 - Neméthy, G. and Scheraga, H.A., J. Phys. Chem. (1962), 66, 30.

50 - Wyckoff, H.W., Hardman, K.D., Allewell, N.M., Inagami, T., Johnson, L.N. and Richards, F.M., J. Biol. Chem. (1967), 242, 3984.

51 - Kendrew, J.C., Sci. Amer. (1961), 205, 96.

52 - Wright, C.S., Alden, R.A. and Kraut, J., Nature (1969), 221, 235.

53 - Cohn, E.J., and Edsall, J.T., Proteins Amino Acids and Peptides, Rheinhold Publishing Corporation (1943), 370.

54 - Michaelis, L., and Menten, M.L., Biochem. Z., (1913), 49, 333.

55 - Lineweaver, H., and Burk, D., J. Amer. Chem. Soc. (1934) 56, 658.

56 - Dixon, M., Biochem. J. (1953), 44, 161.

57 - Jones, J.B., and Wigfield, D.C., Canad. J. Biochem. (1968), 46, 1459.

58 - Neudert, W., and Ropke, H., Atlas of Steroid Spectra, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg (1965).

59 - Johnson, F.H., Eyring, H., and Williams, J., Cellular Comp. Physiol. (1942), 20, 247.

60 - Scatchard, G., Ann. N.-Y. Acad. Sci. (1949) 51, 660.

61 - Dixon, M., and Webb, E.C., in Enzymes (1958), Longmans Green and Co. London, p. 150.

62 - Michaelis, L., and Davidsohn, H., Biochem. Z., (1911), 35, 386.

63 - Eyring, H., J. Chem. Phys., (1935), 3, 107.

64 - Gutfreund, H., Trans. Faraday, Soc. (1955), 51, 441.

65 - Cohn, H., and Edsall, J.T., in Proteins, Peptides and amino acids, Reinhold Publishing Co., N.Y. (1943) p. 83.

66 - Wheland, G.W., in Advanced Organic Chemistry, New York, Wiley, (1960), p. 515.

67 - Schedlovsky, T., and Kay, R.L., J. Phys. Chem. (1956) 60, 151.

68 - Talalay, P. (communications personnelles)

69 - Folk, J.E. and Cole, P.W., Biochim. Biophys. Acta (1966), 122, 244.

70 - Wang, J.H., Science (1968), 61, 328.

71 - F. Vincent (résultats non encore publiés).

72 - Jones, J.B. and Wigfield, D.C., J. Am. Chem. Soc. (1967), 89, 5294.

73 - Kauzmann, W., dans A symposium on the mechanism of enzyme action. W.D. McElroy and Glass, B., Eds., John Hopkins University Press (1954), p. 70.

74 - Falcoz-Kelly, F., Baulieu, E.E., and Alfsen, A., Biochemistry (1968), 7, 4119.

75 - Weintraub, H., Baulieu, E.E. and Alfsen, A., Biochim. Biophys. Acta, (1972). 258, n° 2. 655.

76 - Hansch, C., Deutsch, E.W. and Smith, R.N., J. Amer. Chem. Soc., (1965), 87, 2738.

77 - Hammett, L.P., J. Am. Chem. Soc. (1937), 59, 660.

78 - Jaffe, H.H., Chem. Rev. (1953), 53, 191.

79 - Glick, D., Methods in Biochem. Analys. (1956), 3, 265.

80 - Collander, R., Acta Chem. Scand. (1951), 5, 774.

81 - Collander, R., Physiol. Plant. (1954), 7, 420.

82 - Fujita, T., Iwasa, J., and Hansch, C., J. Amer. Chem. Soc. (1964), 86, 5175.

83 - Kiehs, K., Hansch, C., and Moore, L., Biochemistry (1966), 5, 2602.

84 - Hansch, C., Steward, A.R., Anderson, D.S.M., and Bentley, D., J. Med. Chem., (1967), 11, 1.

85 - Hepler, L.G., J. Amer. Chem. Soc. (1963), 85, 3089.

86 - Leffler, J.E. and Grünwald, E., dand Rates and equilibria of organic reactions. J.Wiley and Sons,N.Y.(1963

87 - Pople, J.A., Proc. Roy. Soc. (London), (1951) A 205,163.

88 - Némethy, G., Annali. Inst. Super. Sanita (1970), VI

89 - Franks, F., and Ives, D.J.D., Quaterly Rev. (1966) 20, 1.

90 - Hall, L., Phys. Rev. (1948), 73, 775.

91 - Davis, Jr. C.M., and Litovitz, T.A., J. Chem. Phys. (1965), 42, 2563.

92 - Marchi, R.P., and Eyring, H., J. Phys. Chem. (1964) 68, 221.

93 - Jhon, M.S.J., Grosh, T.R., and Eyring, H., J. Chem. Phys. (1966), 44, 1465.

94 - Eyring, M., and Jhon, M.S. dans "Significant liquid Structures", J. Wiley and Sons, New-York (1969).

95 - Némethy, G., and Scheraga, H., J. Chem. Phys. (1962) 36, 3382.

96 - Buijs, K., and Chopin, G.R., J. Chem. Phys. (1963) 39, 2035.

97 - Vand, V., and Senior, W.A., J. Chem. Phys. (1965), 43, 1869, 1878.

98 - Franck, H.S., and Wen, W.Y., Discuss. Faraday Soc. (1957), 24, 133.

99 - Lumry, R., and Rajender, S., Biopolymers, (1970), 9, 1125.

100 - Roginsky, S., and Rosenkewisch, L., Z. Physik. Chem. (1930), 103, 47.

101 - Fairclough, R.A., and Hinshelwood, C.N., J. Chem. Soc. London, (1937), 538.

102 - Doherty, D., and Vaslow, F., J. Amer. Chem. Soc. (1952), 74, 931.

103 - Doherty, D., and Vaslow, F., J. Amer. Chem. Soc. (1953), 75, 928.

104 - Exner, O., Collection Czechoslov. Chem. Commun. (1964), 29, 1094.

105 - Likhtenstein, G.I., Biofizika (1963), 11 (1), 23.

106 - Likhtenstein, G.I., and Sukhorov, B.I., Biofizika (1965), 10, 925.

107 - Likhtenstein, G.I., and Sukhorov, B.I., Zhur. Fiz. Khim (1963), 38, 747.

108 - Hepler, L.G., J. Amer. Chem. Soc. (1963), 85, 3089.

109 - Ives, D.I.G., and Mardsen, P.D., J. Chem. Soc. (London) (1965), 649.

110 - O'Hara, W.G., and Hepler, L.G., J. Phys. Chem. (1961), 65, 2107.

111 - Bertrand, G.L., Millero, J.J., Wu, C.H., and Hepler, L.G., J. Chem. Phys. (1966), 70, 699.

112 - Hepler, L.G., J. Chem. Phys. (1957), 61, 1426.

113 - Ritchie, C.D., and Sager, W.F., Prog. Phys. Org. Chem., (1964), 2, 323.

114 - Marshall, H.P., and Grünwald, E., J. Chem. Phys. (1953), 21, 2143.

115 - Akerlöf, G., J. Amer. Chem. Soc., (1932), 54, 4125.

116 - Fairclough, R.A., and Hinshelwood, C.N., J. Amer. Chem. Soc. (London), (1937), 1573.

117 - Blackadder, D.A. and Sir Cyril Hinshelwood, J. Chem. Soc. (London) (1958), 2720.

118 - Brown, R.F., J. Org. Chem., (1963), 27, 3015.

119 - Bell, R.P., J. Chem. Soc. (London) (1943), 629.

120 - Ralph, E.D. and Grünwald, E., J. Am. Chem. Soc. (1969), 91, 2429.

121 - Belleau, B., and Lavoie, J.L., Canad. J. Biochem. (1968), 46, 1397.

122 - Belleau, B., Ann. N.-Y. Acad. Sci. (1967) 144, 705.

123 - Seal, U.S., and Doe, R.P., J. Biol. Chem. (1962), 237, 3136.

124 - Sandberg, A., Rosenthal, H., Schneider, S.L. and Slaunwhite, Jr. W.R., Steroid Dynamics, G. Pincus Ed. Acad. Press (1966), 1.

125 - Wesphal, U., Mechanism of Steroid Hormones, Villee C., Engel, L., Eds. (1963), 33.

126 - Lebeau, M.C. and Baulieu, E.E., J. Clin. Endocr. Metab. (1970), 30, 166.

127 - Mercier-Bodard, C., Alfsen, A., et Baulieu, E.E., Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, Acta Endocr. Supp. 147, 64, 204,(1970).

128 - Baulieu, E.E., Alberga, A., Jung, I., Lebeau, M.C., Mercier-Bodard, C., Milgrom, E., Raynaud, J.P., Raynaud-Jammet, C., Rochefort, H., Truong, H., and Robel, P., Recent Progr. Hormone Res.,(1971) 27,351.

129 - Hospital, M., Busetta, B., Bucourt, R., Weintraub,H., and Baulieu, E.E. : X-Ray crystallography for Estrogens and Binding to Receptor Sites. Soumis à Molecular Pharmacology.

130 - Dodds, E.C., Goldberg, L., Lawson, W., and Robinson R., Nature (1938), 141, 247.

131 - Jacques, J., Bull. Soc. Chim. (1949), 16, 411.

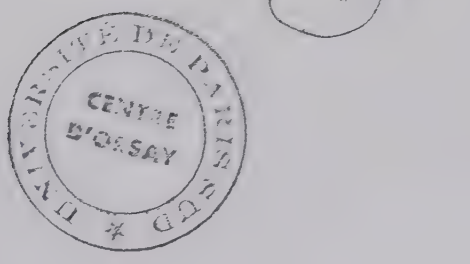
132 - Truong, H., Geynet, C., Millet, C., et Baulieu, E.E., à paraitre dans "Hormones and Antagonists", P.O. Hubinon, F. Leroy, C. Robyn et P. Leleux Eds., S. Karger, Bâle, (1972).

133 - Biochem. J. (1969), 113, 5. IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données

Vu et approuvé :

Orsay, le 12 Avril 1972

Le Vice-Président du Centre d'Orsay :